ZUR BEDEUTUNG VON THIOLEN FÜR DIE AUFNAHME VON CALCIUM IN DIE ZELLEN LANGERHANSSCHER INSELN VON RATTEN

UNTERSUCHUNGEN AN FOETALEN, NEUGEBORENEN, ERWACHSENEN UND ALTEN RATTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG STRÖLIN
aus Esslingen

1983

Tag der mündlich Prüfung: 4. Februar 1983

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Susanne

und

meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im April 1980 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Februar 1983 abgeschlossen.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon

danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Die Bedeutung von Calciumionen für die Insulinsekretion	1
1.2.	Die Bedeutung von Glukose für die Insulinsekretion	7
1.3.	Ionophor A 23187	10
1.4.	Insulinsekretion bei Foeten	12
1.5.	Insulinsekretion bei Neugeborenen	16
1.6.	Insulinsekretion bei 2 Jahre alten Ratten	19
1.7.	Fragestellung	23
2.	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1.	Versuchstiere	25
2.1.1.	Erwachsene und alte Ratten	25
2.1.2.	Foeten und Neugeborene	25
2.2.	Geräte	27
2.3.	Chemikalien und Enzyme	28
2.4.	Elektrolytlösungen	30
2.4.1.	Hanks' Lösung	30
2.4.2.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	31
2.4.3.	Tris-Puffer-Lösung	32
2.5.	Inkubationsmedien	33
2.5.1.	Vorinkubationsmedium	33
2.5.2.	Hauptinkubationsmedium	33
2.5.3.	Lanthanwaschung	34
2.6.	Experimenteller Teil	35

2.6.1. Isolierung der Langerhansschen Inseln nach Lacy und Kostianovsky 35
2.6.2. Isolierung der Langerhansschen Inseln bei foetalen und neugeborenen Ratten 37
2.6.2.1. Schnittentbindung 37
2.6.2.2. Entnahme des Pankreas 37
2.6.3. Vorinkubation der Inseln 38
2.6.4. Hauptinkubation der Inseln 38
2.6.4.1. Hauptinkubation mit Insulin-Antikörper 39
2.6.4.2. Hauptinkubation mit Ionophor A 23187 und DIP 39
2.6.4.3. Hauptinkubation mit Inseln von foetalen, neugeborenen, erwachsenen oder 2 Jahre alten Ratten 39
2.6.4.4. Hauptinkubation mit reduziertem Glutathion 40
2.6.4.5. Hauptinkubation mit oxidiertem Glutathion 40
2.6.5. Lathanfixierung 41
2.6.6. Vorbereitung der Proben zur Messung 43
2.6.7. Bestimmung des Backgrounds 43
2.6.8. Bestimmung des Thiolgehaltes 44
2.7. Berechnung und Statistik der Meßergebnisse mit 45-Calcium 45
2.7.1. Umrechnen der Meßergebnisse auf das Kalibrierungsdatum 45
2.7.2. Bestimmung des Backgrounds und dessen Einbeziehung in die Ergebnisse der Proben 45
2.7.3. Bestimmung der Effiency des Counters 46
2.7.4. Umrechnen von DpM in fmol 46
2.7.5. Statistische Auswertung 47

3.	E R G E B N I S S E	48
3.1.	Ermittlung der Aufnahme von 45-Calcium in Langerhanssche Inseln in Gegenwart von Glukose und Insulin-Antikörper	48
3.2.	Einfluß von Ionophor A 23187 und DIP auf die 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln	48
3.2.1.	Erstellen der Methode	48
3.2.2.	Einfluß von DIP auf die durch Ionophor A 23187 hervorgerufene Aufnahme von 45-Calcium in Langerhanssche Inseln	51
3.3.	Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calciumaufnahme Langerhanssche Inseln erwachsener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose	56
3.4.	Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calciumaufnahme Langerhanssche Inseln foetaler Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose	56
3.5.	Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calciumaufnahme Langerhanssche Inseln neugeborener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose	61
3.6.	Vergleich der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von erwachsenen, foetalen und neugeborenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose	61
3.7.	Einfluß von oxidiertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose	68

3.8. Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose 71

3.8.1. Bestimmung der Stabilität von reduziertem Glutathion im Inkubationsmedium 71

3.8.2. Bestimmung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln bei Zusatz von reduziertem Glutathion 71

3.9. Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von foetalen und neugeborenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose 76

3.10. Vergleich der 45-Calciumaufnahme bei foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose und von reduziertem Glutathion 81

3.11. Untersuchung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von 24 Monate alten Ratten im Vergleich zu 3 Monate alten Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose 81

3.12. Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von 24 Monate alten Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 M Glukose 88

4. D I S K U S S I O N 96

4.1. Beziehung zwischen Insulin-Antikörper und der Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln 96

4.2. Einfluß des Ionophors A 23187 auf den Calcium-influx und die Insulinsekretion 98

4.3. Calciumaufnahme bei Inseln foetaler Ratten 100

4.4. Einfluß von exogenem GSH auf die Calciumaufnahme 101

4.5. Calciumaufnahme bei Inseln foetaler Ratten unter Einfluß von exogenem GSH 102

4.6. Calciumaufnahme bei Inseln neugeborener Ratten und Beeinflussung durch zugesetztes GSH 103

4.7. Calciumaufnahme bei Inseln alter Ratten und dessen Beeiflussung durch zugeführtes GSH 104

5. Z U S A M M E N F A S S U N G 106

5.1. Zielsetzung 106

5.2. Ergebnisse 107

5.3. Schlußfolgerungen 108

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 110

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536515_0008

Abkürzungen :

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
CMS	para-Chlormercuribenzolsulfonsäure
CPDS	Bis-(5-carboxy-2-pyridyl)-disulfid
D 600	(α-isopropyl-α(N-methyl-N-homoveratril)-γ-aminopropyl)-3,4,5-trimethoxyphenyl-acetanitril
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DIMB	5,5'-Dinitro-bis-(2-nitrobenzoesäure)
EGTA	Bis-(aminoäthyl)-glycoläthyl-N,N.N',N'-tetraessigsäure
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
pCMB	para-Chlormercuribenzoat
p.p.	post partum
PPS	Pentosephosphatshunt

1. EINLEITUNG

1.1. Die Bedeutung von Calciumionen für die Insulinsekretion.

Grodksy und Bennet (1966) untersuchten als erste am isolierten und perfundierten Pankreas die Bedeutung der Kationen für die Sekretion von Insulin und stellten fest, daß Calcium eine große Rolle dabei spielt. Curry et al. (1968) bestätigten diese Ergebnisse am perfundierten Pankreas. Bei in vivo Versuchen konnten Little-Dike et al. (1968) zeigen, daß eine Hypocalcämie zu einer Hemmung der Insulinsekretion führt. Geake et al. (1975) beobachteten bei einem Patienten mit Inselzelltumor eine deutliche Erhöhung der Freisetzung von Insulin und Proinsulin nach Calciuminfusionen.

Weitere Untersuchungen zahlreicher Arbeitsgruppen haben ergeben, daß intrazelluläre Calciumionen bei der Erregung der ß-Zelle als Messenger eine Schlüsselrolle spielen (Malaisse, 1973), und dabei Wechselbeziehungen zu dem ebenfalls als intrazellulärem Messenger fungierenden cAMP bestehen (Howell et al., 1975).

Nach Montague (1977) beträgt die Konzentration an ionisiertem Calcium in der ß-Zelle etwa 0,1 - 1 uM, während extrazellulär 1 - 3 mM vorliegen, weshalb die meisten Autoren in ihren Versuchen eine Mediumskonzentration von 2,6 mM Calciumionen verwenden. Howell (1977) untersuchte mit verschiedenen Methoden (Praecipitatmethode mit Pyroantimonat, X-ray Micro-Analyse, 45-Calcium-Methode) die Verteilung des Calciums in der ß-Zelle und fand dabei, daß in den Mitochondrien und Granula wesentlich

mehr, im Zellkern dagegen viel weniger Calcium vorliegt als im Cytoplasma. Die Aufrechterhaltung der verschiedenen Calciumkonzentrationen bzw. ihre Änderung bei der Insulinsekretion wird durch verschiedene Transportmechanismen bewirkt.

A. Calciuminflux der ß-Zelle aus dem Extrazellulärraum.

a) Der unspezifische, passive Calciumioneneinstrom erfolgt entlang dem Konzentrationsgefälle (1 : 1000) und wird von Calciumantagonisten nicht gehemmt. Er ist vom Erregungszustand und Membranpotential der Zelle unabhängig, macht allerdings nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtinflux aus (Rasmussen, 1970).

b) Der für die intrazelluläre Funktion notwendige Calciuminflux erfolgt über Calciumkanäle, die mit Lanthan (Hellman et al., 1976), Kobalt (Henquin et al., 1975) oder organischen Calciumantagonisten wie Nifedipine (Malaisse et al., 1977 a) oder Verapamil (Malaisse et al., 1977 b) blockierbar sind. Herchuelz et al. (1980) konnten zeigen, daß diese Kanäle erst durch eine Depolarisation geöffnet werden.

Durch hohe Kaliumionenkonzentrationen (20 mM) im Inkubationsmedium, welche eine Depolarisation bewirken, konnte der Calciuminflux und die Insulinsekretion kurzzeitig stark erhöht werden. Auch eine Verminderung der Natrium-Ionenkonzentration führt zu einem kurzen Calciuminflux und zur Insulinsekretion (Hellman et al., 1978).

B. Intrazelluläre Calciumumverteilung

a) Für den aktiven Transport und die Anreicherung von Calciumionen in den Mitochondrien (Robertsen, 1976) und in die Granula (Schäfer, 1979) ist die Anwesenheit von ATP und einem oxidierbaren Substrat notwendig. Die Calciumanreicherung in den Mitochondrien erfolgt nur im Ruhezustand der Inselzelle. Ein gesteigerter Glukosemetabolismus, der möglicherweise zugleich ein Aktivierungsignal für die ß-Zelle ist, hemmt die Calciumaufnahme in die Mitochondrien (Sudgen et al., 1978).

b) Ein höherer Gehalt an cAMP durch den Phosphodiesterasehemmstoff Theophyllin steigert die Abgabe von Calcium aus den Mitochondrien in das Plasma (Brisson et al., 1972). Auch Glukose (Grill und Creasi, 1975) oder Sulfonylharnstoffe (Charles et al., 1976) führen zu einem Anstieg von cAMP und damit zur Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien. Malaisse (1973) und Lacy (1975) konnten aber zeigen, daß diese Calciumfreisetzung für eine Insulinsekretion nicht ausreicht, wenn durch den Stimulus nicht auch ein Calciuminflux von außen hervorgerufen wird.

C.) Calciumefflux aus der ß-Zelle

a) Bei Erhöhung der Glukosekonzentration ist der frühe Calciumefflux mit einer Dauer von 1 - 2 Minuten deutlich geringer als der vorher herrschende Calciumausstrom und auch als der späte Efflux. Die Hemmung des frühen Efflux wird als eine energieabhängige Änderung der Zellmembran-

affinität für Calcium erklärt (Formby et al., 1976). Von Löffler und Kemmler (1975) wird in diesem Zusammenhang eine durch Calcium aktivierbare ATP-ase in der Inselzellmembran diskutiert.

b) Der späte Efflux nach Erhöhung der Glukosekonzentration weist eine starke Steigerung des Calciumausstromes auf (Malaisse et al., 1973), der zeitlich mit der Insulinsekretion zusammenfällt und auch genauso lange dauert. Schäfer (1979) konnte elektronenmikroskopisch nachweisen, daß die Akkumulation von Calcium an den Sekretionsgranula ein Charakteristikum der aktivierten ß-Zelle ist. Daher wäre es naheliegend anzunehmen, daß dieser Efflux zusammen mit Insulin durch die Sekretionsgranula stattfindet, zumal Herchuelz et al. (1978) beobachteten, daß bei Entfernen der Glukose aus dem Inkubationsmedium Insulinsekretion und Calciumefflux gleichermaßen aufhören. Wird die glukoseinduzierte Insulinsekretion durch Hunger, L-Adrenalin (Gylfe et al., 1978 a), den organischen Calcium-Antagonisten D 600 (Malaisse et al., 1976 c) oder Somatostatin (Kikuchi et al., 1976) gehemmt, findet dennoch der späte Calciumefflux statt, was im Widerspruch zu der vorigen Theorie steht. Weiterhin fanden Herchuelz et al. (1978), daß zwar eine Insulinsekretion stattfindet, wenn im extrazellulären Medium Calcium durch Barium ersetzt wird, aber keine Calciumionen die Zelle verlassen. Wird aber der Calciumeinstrom durch hohe Magnesiumkonzentrationen (Malaisse et al., 1976 a) oder EGTA (Gylfe et al., 1978 b) gehemmt, so

findet kein später Efflux und keine Insulinsekretion statt. Herchuelz und Malaisse (1978) ziehen daraus den Schluß, daß der späte Efflux mit dem Influx korreliert, und Gylfe und Hellman (1978 b) vermuten, daß die Depolarisation der Zellmembran, die am Anfang der Stimulations-Sekretions-Kette steht und schon für den Influx verantwortlich ist, auch den gesteigerten Efflux bewirkt.

Ob alle diese Calciumtransportwege für die Insulinsekretion notwendig sind, ist bis heute unklar. Die intrazelluläre Freisetzung und Rückspeicherung von Calcium bei der Stimulation durch Glukose spielt sicher nicht die entscheidende Rolle, da eine gesteigerte Calciumumlagerung von den Mitochondrien in das Cytoplasma durch einen erhöhten cAMP-Gehalt, was durch Theophyllin zu erreichen ist, nicht zur Insulinsekretion führt. Nach Brisson et al. (1972) wird das so freigesetzte Calcium sofort über einen gesteigerten Efflux aus der Zelle entfernt. In Kombination mit einem anderen Stimulus führt Theophyllin allerdings zu einer vermehrten Insulinsekretion.

Die Funktion der ß-Zelle ist von einer ausreichenden Versorgung mit Calcium aus dem Extrazellulärraum während der Sekretion abhängig. Sie kann ihren Calciumbedarf nicht für kurze Zeit aus den eigenen Depots decken, wie das bei vielen anderen Geweben z.B. der Muskelzelle der Fall ist. Allerdings wird dem Calciumefflux bei der ß-Zelle eine wesentlich größere Bedeutung zugemessen als in anderen Geweben.

Ein Überangebot von Calciumionen gibt eine kurzfristige Insulinsekretion. So konnten Devis et al. (1977) zeigen, daß ein

perfundiertes Pankreas nach Steigerung der Calciumkonzentration im Medium von 2 auf 10 mM für 5 Minuten Insulin sezerniert, obwohl keine Glukose zugegeben wurde. Durch Theophyllin konnte dieser Effekt noch verstärkt werden. Auch bei Steigerung des Calciuminfluxes durch Ionophor A 23187 (Somers et al., 1976 b) konnte eine kurze, starke Insulinsekretion beobachtet werden.

1.2. Die Bedeutung von Glukose für die Insulinsekretion.

Es gibt heute zwei Theorien, nach denen eine Steigerung der Glukosekonzentration im Extrazellulärraum eine Insulinsekretion bewirken soll.

a) Nach Matschinsky et al. (1972) reagiert das Glukosemolekül mit einem Rezeptor in oder auf der Zellmembran, da die Metaboliten des Glukoseabbaues erst nach Beginn der Insulinsekretion nachweisbar sind. Auch Stoffe, die nicht über Glukose-6-Phosphat abgebaut werden, aber eine der Glukose ähnliche Struktur haben, wie z.B. Galaktose, Fruktose oder Mannose, stimulieren die Insulinsekretion, allerdings erst in höheren Konzentrationen. Nach Pagliara et al. (1975) soll Glukose mit SH-Gruppen des postulierten Rezeptors reagieren. SH-Reagenzien wie DTMB oder CPDS, die nicht durch die Zellmembran dringen, aber benachbarte Thiolgruppen zu Disulfidbrücken oxidieren, führen ohne Glukose zur Insulin- sekretion (Grasetti, 1969). Stoffe wie CMBS (Hellman et al., 1974) oder p-CMB (Ammon et al., 1977), die mit SH-Gruppen Mercaptide bilden, bewirken sowohl bei substimulatorischer (3 mM) als auch bei stimulatorischer (20 mM) Glukose- konzentration eine weitere Steigerung der Insulinsekretion.

b) Wird die Glykolyse mit 2-Desoxyglukose blockiert, ist auch die Insulinsekretion verhindert (Kilo et al., 1967). Dem Argument, daß der Zelle dabei der Energielieferant fehlt, steht entgegen, daß ein Zusatz von Pyruvat erst bei einer Konzentration von 60 mM eine Insulinsekretion ergibt (Sener et al., 1978). Malaisse et al. (1976 b) fanden, daß Glycerin-

aldehyd die Insulinsekretion stimuliert, und folgerten daraus, daß dieser Stoff nicht nur Substrat für den Stoffwechsel sondern auch ein entscheidendes Signal für die Insulinsekretion ist. Weiter wird diese Theorie dadurch unterstützt, daß Stoffe wie Tolbutamid, die selbst nicht verstoffwechselt werden, allein keine Insulinsekretion bewirken können, aber zusammen mit Glukose deren Wirkung potenzieren (Ammon, 1973). Darüberhinaus stellt Glukose über den Pentose- phosphatshunt NADPH und dadurch auch reduziertes Glutathion zu Verfügung. Senkt man die Konzentration von NADPH durch Methylenblau (Ammon et al., 1977) oder den Gehalt an GSH durch Diamid (Niklas, 1978) oder DIP (Eujen, 1979), so wird auch die Insulinsekretion vermindert. Daraus schließen Ammon et al. (1979), daß der Pentosephosphatshunt bzw. die Bildung von NADPH und GSH eine entscheidende Rolle in der Stimulations-Sekretions-Kette spielen.

Was die Wirkung der Glukose in Zusammenhang mit der Calciumaufnahme betrifft, wurden bisher folgende Ergebnisse gefunden:

D-Glukose steigert dosisabhängig die Nettoaufnahme von 45-Calciumionen um das 2 bis 3-fache (Lanthanmethode: Helman et al., 1976; Zentrifugation durch Ölschicht: Malaisse et al., 1978). Auch mit der Atomabsorptionsmethode (Boschero et al., 1977) und der Pyroantimonatmethode (Schäfer, 1979) wurde eine Steigerung des Calciuminfluxes nach Glukosegabe gemessen.

Auch Glycerinaldehyd (Malaisse et al., 1976 b) erhöht die Calciumaufnahme.

Sener et al. (1976) fanden, daß eine direkte Korrelation zwischen der Höhe des Laktat-output und sowohl der Insulinsekretion als auch dem Calciuminflux besteht, wobei es nicht relevant war, wodurch der Laktat-output gesteigert oder gehemmt wurde. Sie verwendeten außer Glukose auch Mannose, Fruktose, Galaktose oder Glycerinaldehyd und bestätigten dieses Ergebnis noch durch die Gabe von Theophyllin und an gehungerten Ratten.

Mit substimulatorischen Mengen Glukose (3 mM) steigern D-Mannose oder Tolbutamid (Hellman et al., 1977) den Calciuminflux.

Organische Calciumantagonisten wie Verapamil (Somers et al., 1976 a; Malaisse et al., 1977 b) oder D 600 (Malaisse et al., 1976 c) hemmen dosisabhängig die durch Glukose stimulierte Insulinsekretion. Sener et al. (1978) zeigten, daß eine Verminderung des Gehaltes an NAD(P)H zu einer Reduzierung der Calciumaufnahme und der Insulinsekretion führt.

Die Veringerung der Insulinsekretion durch Verminderung der intrazellulälen Konzentration von GSH mit Diamid (Ammon et al., 1977) oder DIP (Eujen, 1979) ergibt dosisabhängig eine geringere Calciumaufnahme (Hägele, 1981).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß eine Störung sowohl des Glukosemetabolismus als auch der Bereitstellung reduzierten Glutathions über reduziertes NADPH zu einer Verminderung des Calciuminfluxes führt.

1.3. Ionophor A 23187

Ionophor A 23187 ist ein von Streptomyces gebildetes Antibiotikum, das die Eigenschaft besitzt, Erdalkaliionen aus der wässrigen Phase in die organische zu transferrieren. Pfeiffer et al. (1978) fanden, daß 2 Moleküle A 23187 mit einem Calciumion einen Komplex bilden. Die von ihnen gefundene Affinitätskonstante beträgt für Calciumionen $3,7 \times 10^{-7}$. Somers et al. (1976 b) untersuchten, welche Wirkung A 23187 auf die Insulinsekretion hat, nachdem Reed et al. (1972) die Wirksamkeit von A 23187 an Membranen untersucht hatten. Somers fand, daß A 23187 in Konzentrationen von 10 uM eine kurze, hohe Insulinsekretion gibt, analog der Sekretion, die bei Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration von 2 auf 10 mM beobachtet wird (Devis et al., 1975). Er zeigte weiterhin, daß EGTA die durch A 23187 induzierte Insulinsekretion vollständig hemmt, Verapamil sie dagegen dosisabhängig mindert. Dabei liegt allerdings die Konzentration des Verapamils um den Faktor 10 (!) höher, als beim Einsatz dieses Calciumantagonisten zur Hemmung der durch Glukose induzierten Insulinsekretion (Malaisse et al., 1977 b).

Bei Untersuchungen des Calciumtransfers von einer wässrigen in eine organische Phase fanden Malaisse et al. (1981), daß die Wirkung von A 23187 auch in diesem in-vitro-Experiment durch Verapamil oder Soluctidil gemindert wird. Somit beruht die Hemmung des mit A 23187 bewirkten Calciuminfluxes durch Verapamil nicht auf einer Blockierung der Calciumkanäle, sondern auf einer Reaktion zwischen Verapamil und Calcium.

Couturier et al. (1980) zeigten in einem gleichartigen Versuchsaufbau, daß der Sulfonylharnstoff Gliclazid allein den Calciumtransfer geringfügig erhöht, aber zusammen mit A 23187 eine enorme Steigerung erfolgt. Wird anstelle von A 23187 ein getrocknetes, solubilisiertes Inselhomogenat eingesetzt, so zeigt sich ebenfalls ein gesteigerter Calciumtransfer von der wässrigen in die organische Phase (Valverde et al., 1979). Daher ist es naheliegemd, in der Inselmembran Substanzen mit ionophoretischen Eigenschaften zu vermuten.

1.4. Insulinsekretion bei Foeten

Bei verschiedenen Untersuchungen wurde bereits festgestellt, daß die Langerhansschen Inseln erst einige Zeit nach der Geburt in der Lage sind, auf eine Stimulierung durch Glukose mit einer Insulinsekretion zu antworten. Dies wurde sowohl in vivo beim Menschen (Thoroll, 1970), beim Affen (Mintz et al., 1969) und Schaf (Willes et al., 1969) als auch in vitro beim Menschen (Espinosa et al., 1970), Kaninchen (Milner, 1969) und der Ratte (Asplund et al., 1969) festgestellt. Riet et al. (1967) fanden dagegen beim Rinderfoetus eine durch Glukose stimulierbare Insulinsekretion.

Bemerkenswert sind dazu die Ergebnisse von Agren et al. (1976), gemäß denen 2 Stunden alte Ratten nicht auf Glukose, wohl aber auf Glycerinaldehyd mit einer Insulinsekretion reagieren. Agren et al. nehmen deshalb an, daß der Glukoseabbaumechanismus noch nicht funktionsfähig ist, im Gegensatz zum Sekretionsmechanismus. Im gleichen Arbeitskreis fanden Anderson et al. (1975), daß die Glukosephosphorylierung zunimmt, sobald die Insulinsekretion eintritt.

Heinze und Steinke (1971) meinten dagegen, daß bei Foeten nicht die Glykolyse gemindert ist, sondern eine starke Einschränkung der C-1-Oxidation vorhanden ist. Düppenbecker (1981) konnte dazu zeigen, daß der Glukoseabbau über den PPS bei Foeten nicht gesteigert werden kann. Weiterhin fand Bumiller (1982), daß bei Foeten zwar der Gehalt an NADH, welches aus der Glykolyse stammt, nicht aber die Konzentration an NADPH, das im PPS gebildet wird, durch Glukose gesteigert werden kann. Auch die Bildung des GSH

ist bei Foeten nicht durch Glukose steigerbar (Lutz, 1981). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte die Insulinsekretion durch einen Mangel an GSH, welches über NADPH aus dem PPS gebildet wird, nicht zustande kommen.

Asplund (1973 a) fand bei der Perifusion von foetalen Inseln der Ratte, daß diese auf einen Glukosereiz mit einem schwachen ersten Insulinpeak reagieren. Burr et al. (1971) sahen bei Foeteninseln in Kultur deutlich einen ersten und einen zweiten Insulinpeak, allerdings war die Insulinmenge wesentlich geringer als bei erwachsenen Ratten. Kervan et al. (1980) konnten zeigen, daß bei 17 Tage alten Foeten mit Glukose nur ein Insulinpeak von 10 Minuten zu ereichen war, bei 21 Tage alten Foeten dagegen ein typisch biphasisches Sekretionsprofil auftrat. Daraus läßt sich schließen, daß der Mechanismus der Insulinsekretion auch bei den Foeten schon prinzipiell funktionsfähig ist, aber noch keine größeren Leistungen vollbringen kann.

Bei einer in vitro Untersuchung wurde von Kervan et al. (1976) die Insulinsekretion des Foeten in utero nach Glukoseinfusion bestimmt. Hier zeigte sich ein erster Peak und anschließend ein schwacher, zweiter Anstieg der Insulinsekretion. Sodoyez-Goffaux et al. (1981) beschreiben, daß bei 21 Tage alten, durch einen Kaiserschnitt geborenen, aber nicht abgenabelten Foeten ein erhöhter Plasmainsulinspiegel feststellbar ist. Bei den Kontrolltieren, die abgenabelt wurden, zeigte sich keine Insulinsekretion. Daraus schlossen die Autoren, daß über die Plazenta ein Stoff in das foetale Blut gelangt, der die Insulinsekretion anregt. Diskutiert werden hier Aminosäuren wie Arginin oder Leucin.

Freie et al. (1975) konnten zeigen, daß die mangelnde Ansprechbarkeit der foetalen Insel nicht an einem Defekt in der Insulinbildung oder Speicherung liegt. Die ß-Zellgranulation zeigte am 22. Tag der Schwangerschaft bereits dieselben Werte wie bei Erwachsenen. Auch ist der prozentuale ß-Zellanteil in der Insel kurz vor der Geburt so hoch wie bei Erwachsenen. Es gelang auch schon in 11 Tage alten Foeteninseln elektronenmikroskopisch sowohl Proinsulin als auch Glukagon nachzuweisen (Asplund et al., 1975). Dies legt die Vermutung nahe, daß die anderen Untersuchungsmethoden aufgrund der sehr geringen Insulinkonzentration versagen.

Clark et al. (1972) gelang der Nachweis, daß in der foetalen Insel bereits am 11. Tag der Schwangerschaft Proinsulin synthetisiert wird. Ab dem 14. Tag findet die Umwandlung von Proinsulin zu Insulin statt (Clark et al., 1969). Asplund (1973 b) konnte mit radioaktiv markiertem Leucin zeigen, daß die foetale Biosynthese von Proinsulin durch Glukose stimulierbar ist. Im Blut des Foeten läßt sich Insulin erst ab dem 17. Tag der Schwangerschaft nachweisen (Asplund et al., 1975).

Weiterhin versuchten verschiedene Autoren die Insulinsekretion der Foeteninsel außer mit Glukose auch mit anderen Substanzen zu steigern. So konnte mit Sulfonylharnstoffen wie Tolbutamid (Lambert et al., 1969) oder Glibenclamid (Heinze et al., 1975 a) zusammen mit Glukose eine deutlich höhere Insulinsekretion beobachtet werden als mit Glukose allein. In der Perifusion zeigt Glibenclamid (1 ug/ml) plus Glukose (16,7 mM) deutlich die 2. Sekretionsphase, die mit Glukose allein kaum sichtbar ist. Auch die Aminosäuren Arginin (Heinze et al., 1972) oder Leucin

(Sodoyez-Goffaux et al., 1979) führten zusammen mit Glukose zu einer wenn auch sehr schwachen Insulinsekretion.

Außerdem gelang es beim Foeten die Funktionsfähigkeit des c-AMP-Systems nachzuweisen (Kervan et al., 1980). Mit 5 mM Theophyllin und 13,9 mM Glukose konnte eine Steigerung der Insulinsekretion von 65% erzielt werden, was mit Beobachtungen an erwachsenen Tieren im Einklang steht. Lambert et al., (1971) stellten dazu fest, daß Glukose (16,7 mM) allein bei foetalen Inseln nur den ersten Peak der Insulinsekretion zeigt, zusammen mit Theophyllin (2,5 mM) aber ein biphasischer Sekretionsverlauf wie bei Erwachsenen zu sehen ist. Aus der Tatsache, daß die Hemmung der Phosphodiesterase nicht nur zur Insulinsekretion sondern auch zu einem Sekretionsprofil wie bei Erwachsenen führt, folgerten sie, daß das c-AMP-System sowohl an der Insulinsekretion als auch an der Reifung des Sekretionsmechanismus beteiligt ist.

Aus all diesen Beobachtungen ergibt sich, daß die ß-Zelle der foetalen Ratte zwar eine funktionierende Biosynthese und Speicherung von Insulin hat und auch auf stimulierende Reize reagieren kann, aber die Sekretionsleistung im Vergleich zu erwachsenen Ratten verschwindend gering ist. Welcher Schritt in der Stimulations-Sekretions-Kette bei der Geburt noch nicht voll ausgebildet ist, oder ob die Sekretion an einer Stelle auf irgendeine Art gehemmt wird, ist noch nicht klar.

1.5. Insulinsekretion bei Neugeborenen

Da bei Foeten bereits gezeigt wurde, daß die Insulinsekretion, wenn auch sehr schwach, funktioniert, beschränken sich die Untersuchungen bei Neugeborenen darauf, ab wann die Sekretion voll leistungsfähig ist. Asplund (1973 a) stellte bei der Perifusion von Pankreasstücken fest, daß Neugeborene am 1. Tag nur eine schwache 2. Sekretionsphase zeigen, die aber wesentlich stärker ist als bei Foeten. Ab dem 6. Tag ist ein Sekretionsprofil wie bei Erwachsenen zu sehen, allerdings mit der Einschränkung, daß die Insulinmenge pro Gramm Inseltrockengewicht nur etwa 20% im Vergleich zu erwachsenen Tieren beträgt. Hellerström et al. (1974) konnten diesen Befund belegen.
Andersson et al. (1975) fanden, daß sich bei Neugeborenen Glukosephosphorylierung und Insulinsekretion in gleichem Maße entwickeln. Parallel dazu zeigt sich das Auftreten einer high-KM-Hexokinase in der Langerhansschen Insel (Agren et al., 1975).
Was den Abbau der Glukose betrifft, ist nach der Geburt die Abbaurate über den PPS gesteigert (Düppenbecker, 1981). Auch läßt sich am 5. Tag p.p. der PPS etwa im selben Maße durch Glukose stimulieren wie bei Erwachsenen. Bumiller (1982) konnte dazu zeigen, daß sich der NADPH-Gehalt bei 5 Tage alten Neugeborenen durch Glukose genauso wie bei Erwachsenen auf nahezu das Doppelte steigern bzw. der Gehalt an NADP senken läßt, allerdings liegen die Absolutwerte noch um 20% tiefer als bei den Inseln Erwachsener. Auch der Gehalt an GSH nimmt bei 5 Tage alten Neugeborenen zu, aber hier zeigt sich noch ein großer Unterschied

zu den erwachsenen Ratten (Lutz, 1981). Betrachtet man den Quotienten aus GSH und GSSG, so sieht man bei den Neugeborenen wesentlich schwächere Änderungen als bei Erwachsenen.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht der Befund von Asplund (1973 b), daß Neugeborene eine niedrigere Biosyntheserate haben als Foeten bzw Erwachsene. Freie et al. (1975) konnten dazu zeigen, daß bei Foeten am 20. Tag der Schwangerschaft und bei Erwachsenen ein gleich großer Anteil von ß-Zellen in der Insel vorliegt, bei Neugeborenen aber dieser Anteil eindeutig geringer ist.

Auch bei Neugeborenen untersuchten verschiedene Autoren den Einfluß weiterer Substanzen auf dei Insulinsekretion. Mit Arginin (10 mM) war ohne Glukose eine Verdoppelung der Sekretion zu sehen im Gegensatz zu Erwachsenen, die keine Steigerung aufweisen (Heinze et al., 1972). Bei 16,7 mM Glukose und 10 mM Arginin zeigen Erwachsene eine Verdoppelung der Insulinsekretion, die Neugeborenen eine Erhöhung auf 160% im Vergleich mit 16,7 mM Glukose allein. Auch Leucin steigert die Insulinsekretion bei Neugeborenen deutlich (Sodoyez-Goffaux et al., 1979).

Die Sulfonylharnstoffe Tolbutamid (Lambert et al., 1969) oder Glibenclamid (Heinze et al., 1975 b) führen bei neugeborenen Ratten zusammen mit Glukose zu einer ähnlichen Steigerung der Insulinsekretion, wie sie bei Erwachsenen zu sehen ist.

Beim cAMP-System ist auffallend, daß Glukose den cAMP-Gehalt bei Neugeborenen nicht zu erhöhen vermag (Grill et al., 1975 b), andererseits aber der Phosphodiesterasehemmstoff Theophyllin in Gegenwart von Glukose (16,7 mM) zu einer Steigerung der Insulinsekretion führt (Heinze et al., 1972). Taniguchi et al.

(1977) fanden bei einen Tag alten Neugeborenen nach Gabe von 10 mM Adenosin zusammen mit 16,7 mM Glukose dieselbe Sekretionssteigerung gegenüber Glukose allein wie bei Erwachsenen.

Aus all diesen Ergebnissen läßt sich zusammenfassen, daß sich bei Neugeborenen innerhalb der ersten 5 Tage der bereits funktionierende Biosynthese- und Sekretionsmechanismus zur vollen Leistungsfähigkeit entwickelt.

1.6. Insulinsekretion bei 2 Jahre alten Ratten

Viele Autoren haben über eine Verschlechterung der Glukosetolerabz im Alter beim Menschen berichtet (Silverstone et al., 1957, Sandberg et al., 1973, Sinha et al., 1974, Dudl et al., 1977, Fedele et al., 1977). Auch bei der 2 Jahre alten Ratte wurde in verschiedenen Arbeiten eine verminderte Glukosetoleranz im Vergleich zu den jungen Tieren sowohl nach intraperitonealer (Hajdu et al., 1968) als auch nach oraler Glukoseverabreichung (Gold et al., 1976, Brancho-Romero et al., 1977) festgestellt.
Die dafür verantwortliche Ursache konnte trotz verschiedenartiger in-vivo-Versuche nicht festgestellt werden, da sich widersprechende Ergebnisse gefunden wurden. Folgende Gründe werden für die reduzierte Glukosetoleranz beim Menschen diskutiert:

1.) Veringerung der Insulisekretion (Crockford et al., 1966, Barbagallo-Sangiorgi et al., 1970).
2.) Herabsetzung der Wirkung des Insulins im Gewebe (Defronzo 1979).
3.) Vermehrte Sekretion von kaum wirksamen Proinsulin anstatt Insulin (Duckworth et al., 1976).
4.) Verschlechterter Transport der Glukose in die Inselzelle wegen einer Verdickung der Kapillarmembran (Nolan et al., 1973).

Bei all diesen in-vivo-Untersuchungen besteht ein Problem darin, daß die Autoren verschiedene Patientenkollektive hatten, ein weiteres, daß Änderungen der Lebensgewohnheiten älterer Menschen, wie geringere körperliche Tätigkeit oder geänderte bzw.

verminderte Nahrungsaufnahme, die Ergebnisse sicher beeinflussen. Daher ist es nicht erstaunlich, daß bezüglich des Alters auf die Insulinkonzentration im Plasma nach Glukosebelastung verschiedene Aussagen gemacht werden. Woldow et al., (1972) fanden einen erhöhten Insulingehalt im Blut, Yoshino et al., (1979) sahen keinen Unterschied und Zeytinoglu et al., (1969) stellten eine verminderte Insulinkonzentration fest.

Wegen dieser Diffenrenzen ist es naheliegend, den Mechanismus in der isolierten Langerhansschen Insel zu untersuchen. Ammon (1974) fand bei Versuchen an Inseln von 2 Jahre alten Mäusen eine geringere durch Glukose induzierte Insulinsekretion als bei jungen. Codling et al., (1975) konnte dieses Ergebnis an der Ratteninsel bestätigen.

Aufgrund dieser Befunde drängt sich die Frage auf, ob die Ursache dafür, wie dies beim foetalen Tier vermutet wird, in einem veränderten Glukosemetabolismus zu suchen ist. Reaven et al., (1980) stellten fest, daß bei alten Ratten sowohl die Glykolyse als auch der PPS vermindert ist. Jüngste Untersuchungen unseres Arbeitskreises (Amm, 1981) ergaben folgende Ergebnisse: In der Insel der alten Ratte wird bei Erhöhung der Glukosekonzentration von 5,6 mM auf 16,7 mM der Glukoseabbau über den Citratcyclus stärker gesteigert als bei jungen, der Umsatz im PPS dagegen kann wesentlich weniger stimuliert werden. Der daraus theoretisch zu folgernde niedrigere NADPH-Gehalt in der Insel alter Ratten konnte aber nicht gefunden werden (Bumiller, 1982), obwohl bei alten Mäusen dies nachgewiesen werden konnte (Ammon, 1974). Allerdings reagiert die Insel der alten Ratte bei Erhöhen der Glukosekonzentration weder mit einer Steigerung des GSH-Gehaltes

noch einer Änderung des GSH/GSSG-Quotienten (Eujen, 1979), wie das bei erwachsenen Ratten eindeutig nachgewiesen ist (Ammon et al. 1980).

Bei Untersuchungen der Biosyntheserate von Insulin fanden Gold et al. (1981), daß der Einbau von radioaktiv markiertem Leucin in Proinsulin bei der alten Ratte geringer ist als bei der jungen, aber Beginn, zeitlicher Verlauf und Endpunkt der Umwandlung von Proinsulin in Insulin sich bei alten und jungen Ratten gleich verhält.

Hellman (1959) und Remacle et al. (1977) fanden, daß bei alten Ratten wesentlich häufiger große Inseln zu finden sind als bei jungen, woraus eine Steigerung des durchschnittlichen Inselvolumens resultiert (Reaven et al., 1979). Auch berichten Reaven et al. (1979) über eine Zunahme der Inselzellen pro Insel mit fortschreitendem Alter. Sie fanden auch ein deutlich mehr Granula in den ß-Zellen als bei jungen Tieren. Lipson et al. (1981) berichteten in diesem Zusammenhang von einer Erhöhung des Insulingehaltes in der Insel um 40%.

Gold et al. (1981) konnten zeigen, daß die Aminosäure Leucin die Insulinsekretion bei alten Ratten nicht so effizient steigert wie bei jungen. Das ist insofern interessant, da die insolinotrope Wirkung von Leucin unabhängig vom PPS bei alten und jungen Ratten ist (Amm, 1981), sodaß der im Alter ausbleibende Anstieg des PPS zumindest bei der Stimulation mit Leucin nicht als Ursache für die altersbedingte Herabsetzung der Insulinsekretion in Frage kommt.

Die Autorengruppe um Lipson (1981) sieht eine mögliche Ursache für die niedrigere Glukosetoleranz im Alter in der geminderten

Adenylatcyclase-Aktivität, die sie an isolierten Ratteninseln bei gleichbleibender Phosphodiesterase und Proteinkinase-Aktivität fanden. Sie leiten daraus eine mögliche Bedeutung des Adenylcyclase-cAMP-Systems für die abgeschwächte Insulinantwort der Inseln alter Ratten auf Glukosestimulation ab.

Aus all diesen Daten ergibt sich ein sehr unklares, zum Teil sich widersprechendes Bild. Ursache dafür könnte zum einen die verschiedenen Versuchsanordnungen oder Kollektive sein, zum anderen ist es aber auch denkbar, daß im Alter nicht nur ein Schritt in der Stimulations-Sekretions-Kette vermindert ist sondern eventuell mehrere oder daß von Tier zu Tier verschiedene Deffekte auftreten können.

1.7. Fragestellung

1.) Der Ionophor A 23187 steigert die Aufnahme von Calcium in die Langerhanssche Insel und die Sekretion von Insulin (Pfeiffer et al., 1978; Conaway et al., 1976). Der Zusatz des Thioloxidants DIP zum Inkubationsmedium führt bei isolierten Inseln zu einer Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten , zu einer Verminderung der durch Glukose induzierten Insulinsekretion (Eujen 1979) und zu einer Hemmung der durch Glukose stimulierten Calciumaufnahme (Hägele 1981). Von diesen Beobachtungen ausgehend stellte sich die Frage, ob eine Senkung des GSH/GSSG-Quotienten durch das Thioloxidants DIP auch die durch einen Ionophor bewirkte Calciumaufnahme beeinflussen kann.

2.) Aus vielen, bereits in der Einleitung erörterten Untersuchungen ist bekannt, daß Inseln von foetalen Ratten auf einen Glukosereiz hin nicht oder nur äußerst wenig Insulin sezernieren können, daß aber bei Inseln von neugeborenen Ratten die Insulinsekretion ähnlich wie bei Inseln von erwachsenen Ratten durch Glukose stimuliert werden kann. Da die durch Glukose induzierte Sekretion an eine Steigerung der Calciumaufnahme gekoppelt ist, ergibt sich die Frage, ob eventuell die Stimulierbarkeit der Calciumaufnahme bei den Inseln von foetalen Ratten noch nicht entwickelt ist.

3.) Ammon et al. (1980) konnten eine direkte Korrelation zwischen der Glukosekonzentration, dem GSH/GSSG-Quotienten und der Insulinsekretion bei Inseln von erwachsenen Ratten zeigen. Auf der anderen Seite beobachtete Hägele (1981), daß eine Verminderung des GSH/GSSG-Quotienten durch tertiäres Buthylperoxid, Diamid oder DIP zu einem geringeren Calciuminflux führt. Es sollte jetzt untersucht werden, ob exogenes reduziertes Glutathion eine Steigerung der Calciumaufnahme in die Pankreasinsel bewirkt.

4.) Aufgrund der Fragen 3 und 4 war es naheliegend zu untersuchen, ob der Zusatz von reduziertem Glutathion auch den durch Glukose stimulierten den Calciuminflux bei Inseln von foetalen oder neugeborenen Ratten erhöht.

5.) Um den gesammten Lebensbereich der Ratte hinsichtlich der Bedeutung der Calciumaufnahme abzudecken, war es weiterhin von Interesse, die Calciumaufnahme auch bei alten Ratten zu messen. Hier stellte sich dann ebenfalls die Frage, ob der Calciuminflux durch Zusatz von exogenem GSH beeinflußt werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Erwachsene und alte Ratten

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet, die Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe, und Trinkwasser ad libitum erhielten. Das Körpergewicht der erwachsenen Tiere mit einem Alter von 3 bis 5 Monaten betrug zwischen 200 - 350 g, das der alten Tiere mit einem Alter von 2 Jahren betrug 350 - 500 g. Die Haltung erfolgte in einem licht- und temperaturkontrollierten (24 - 26 Grd. Celsius) Raum bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 - 65%.

2.1.2. Foeten und Neugeborene

Die Zucht der foetalen und neugeborenen Ratten erfolgte nach der intermittierend monogamen Methode, bei der jeweils nur ein männliches und ein weibliches Tier während der Paarung zusammen sind.

Das Gewicht der verwendeten Weibchen lag bei 200 - 250 g, das der Männchen bei 300 - 350 g.

Der Brunstzyklus der Ratten umfaßt 4 - 5 Tage (Hagemann, 1960). Davon entfallen zwei Tage auf die Brunst, 2 - 3 Tage auf ein Ruhestadium. Setzt man die Tiere während der Brunst für 24 Stunden in einen Käfig, so kann der Tag der Aufnahme bei dem Weibchen genau bestimmt werden. Die Tiere werden in dieser Zeit

auf einem Drahtgitter gehalten, um den gelblich-roten Vaginalpfropf nach der Kopulation auf dem darunter liegenden, weißen Papier erkennen zu können. Dieser Pfropf sagt nichts über den Erfolg der Begattung aus, die durchschnittlich bei 97% liegt. Die Tragzeit der Ratten beträgt 21 - 23 Tage. Einen Teil der Schwangeren läßt man auf natürliche Weise gebären. Die Jungen dieser Würfe wurden 5 Tage von der Mutter gesäugt und dann bei Versuchen mit Neugeborenen verwendet. Ihr Gewicht betrug zu diesem Zeitpunkt 10 - 12 g.

Beim anderen Teil der Schwangeren wurden am 22. Tag der Schwangerschaft die Foeten durch Schnittentbindung entnommen und zu den Versuchen mit Foeten verwendet. Ihr Gewicht lag hierbei zwischen 4,0 und 5,0 g.

Pro Wurf wurden 8 - 14 junge Tiere erhalten. Für die Versuche wurde jeweils der ganze Wurf verwendet und alle Pankreata gemeinsam aufgearbeitet. War die Anzahl oder das Gewicht der Tiere zu klein, wurde der Wurf nicht verwendet.

2.2. Geräte

Beckmann pH-Meter H 5

Nylonnetze, Fadendicke 50 um, Maschenweite 54 um, Maierthaler, Köln

Olivetti Tischcomputer P 602

Packard TRI CARB Liquid Scintillation Spectrometer Mod. 3385

Plexiglashaube zum Begasen der Proben, Eigenbau

Polystyrolröhrchen, Durchmesser 15 mm, Greiner, Nürtingen

Polystyrolröhrchen, Durchmesser 6,5, mm, beidseitig offen, Greiner, Nürtingen

Schüttelwasserbad, Köttermann, Hänigsen

Spektralphotometer PMG, Zeiss, Oberkochen

Stereomikroskop, Leitz, Jena

Ultraschallbad Econoclean, Spirig, Rapperswil, Schweiz

Mit Nylonnetz einseitig verschlossene Röhrchen für die Proben, 6,5 mm Durchmesser, Eigenbau

2.3. Chemikalien und Enzyme

45-Calciumchlorid	Amersham-Buchler, Braunschweig
Collagenase (126 - 196 uE/mg)	Worthington Biochem.
Ellman's Reagenz (DTNB)	Boehringer Mannheim
Hyaminhydroxid	New England Nuklear Boston, USA
Insulinantikörper	Novo Lab., Kopenhagen
Ionophor A-23187	Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, USA
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan crist.	Boehringer Mannheim
Unisolve I	Zinsser, Frankfurt

Alle weiteren, nicht genannten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

Eigensynthetisierter Stoff

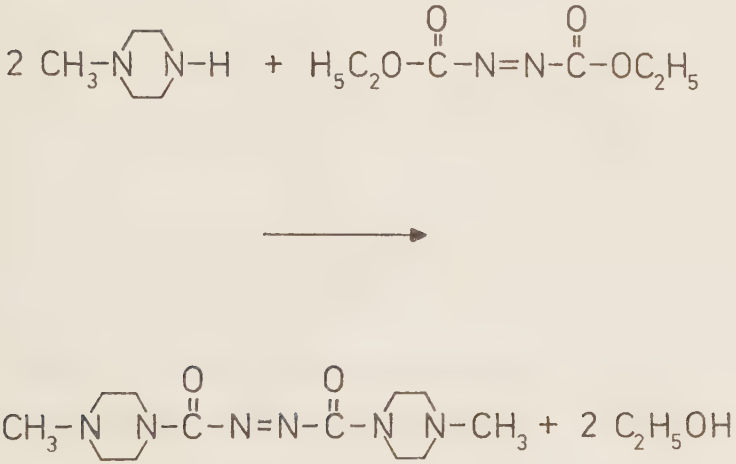
Synthese von DIP

Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid) wurde in Anlehnung an die Methode von Kosower und Mitarbeiter (1974) synthetisiert. 22,75 g N-Methylpiperazin (1 Äquivalent, leichter Überschuß) wurde unter Rühren bei 2 Grd. Celsius langsam zu einer Lösung von 18,9 g (0,5 Äquivalente) Azodicarbonsäurediäthylester in

der entstandene, gelbe Niederschlag abfiltriert, mit absolutem Ether gewaschen und aus n-Hexan/Benzol umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 142 Grd. Celsius

Reaktionsverlauf:



2.4. Elektrolytlösungen

2.4.1. Hanks' Lösung

(Hanks und Wallace 1949)

Stammlösung:

NaCl	80,00 g
KCl	4,00 g
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	0,60 g
KH_2PO_4	o,6o g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	2,00 g
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	1,85 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit destilliertem Wasser 1 + 9 verdünnt, mit 3 mM Glukose versetzt und mit $NaHCO_3$-Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.2. Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
(Umbreit et al. 1972)

Um diese Lösung jederzeit frisch bereiten zu können, erwies es sich als praktisch, drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

Lösung A:	NaCl	69,20 g
	KCl	3,61 g
	KH_2PO_4	1,62 g
	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	2,93 g
	Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Lösung B:	$NaHCO_3$	21,10 g
	Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Lösung C:	$CaCl_2 \times 2 H_2O$	3,73 g
	Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Zum Gebrauch stellte man folgende Mischung her:

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Diese Lösung wurde 60 Minuten mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) begast. Danach wurden 2% Rinderserumalbumin und 0,54 mg Glukose

pro ml zugegeben. Nach Einstellen des pH auf 7,35 stand die Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung für die Vorinkubation zu Verfügung.

2.4.3. Tris-Puffer-Lösung

(Hellman et al. 1976)

Tris	605,5 mg
NaCl	8132,0 mg
KCl	350,2 mg
CaCl2 x 2 H2O	382,0 mg
MgCl2 x 6 H2O	243,6 mg

Die Lösung wurde vor der Inkubation mit Carbogen begast, mit den unter 2.5. angegebenen Zusätzen versetzt und mit HCl oder NaHCO3 auf pH 7,35 eingestellt.

2.5. Inkubationsmedien

2.5.1. Vorinkubationmedium

Zur Vorinkubation wurde Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung (2.4.2.) verwendet, welche 3 mM Glukose und 2% Rinderserumalbumin enthielt.

2.5.2. Hauptinkubationsmedium

Zur Hauptinkubation wurde mit Carbogen begaste Tris-Puffer-Lösung (2.4.3.) verwendet. Pro ml Medium wurden 10 ul einer 45-Calciumchloridlösung zugesetzt, deren Aktivität am Kalibrierungsdatum 2 mCi/ml war. So ergab sich eine Aktivität von etwa 20 uCi pro ml Medium.

Dem Hauptinkubationsmedium wurde entsprechend dem Versuchsplan 3,0 mM, 16,7 mM oder 20,0 mM Glukose zugesetzt.

Bei allen Versuchen mit Ausnahme derer, bei denen dem Hauptinkubationsmedium Ionophor A 23187 zugesetzt wurde, wurden 7,5 mg Rinderserumalbumin pro ml in das Medium gegeben.

Folgende Zusätze wurden bei verschiedenen Untersuchungen verwendet:

Insulin-Antikörper	4000	uE/ml
Ionophor A 23187	0,03	ug/ml = 66,6 uM
DIP	28,20	ug/ml = 0,1 mM
GSH	30,7	ug/ml = 0,1 mM
GSSG	30,6	ug/ml = 0,05 mM

2.5.3. Lanthanwaschung

Zur Lanthanwaschung wurde Tris-Puffer-Lösung (2.4.3.) verwendet. Dieser Lösung waren 490,0 mg/ml Lanthanchlorid (= 2 mM) zugesetzt, sie enthielt aber keine Glukose.

2.6. Experimenteller Teil

2.6.1. Isolierung der Langerhans'schen Inseln nach Lacy und Kostianovsky

Der mit Ether narkotisierten Ratte wurde das Abdomen durch einen Längsschnitt vom Becken zum Brustbein und Querschnitten an den Rippenbögen geöffnet. Unter den Leberlappen wurde das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen, um den Ductus pancreaticus sehen zu können. Dieser wurde dann zur Leber hin mit einem Zwirn abgebunden. Nach Abklemmen des Duodenums zum Magen hin wurden in den Ductus pancreaticus 10 ml eisgekühlte Hanks'-Lösung injiziert. Dadurch wurde das Pankreas aufgebläht und konnte mit einer Schere von Magen, Leber, Milz und Darm abgetrennt werden. Es wurde in eine Petrischale mit eisgekühlter Hanks'-Lösung gelegt.

Nach Entfernen sämtlicher noch vorhandener Fettpartikel wurde das Pankreas mit einer Schere in möglichst gleichmäßig kleine Teilchen zerkleinert, die mit einer 10 ml Rekordspritze aufgesaugt und in einen kalten, vorher tarierten 25 ml Meßzylinder gegeben wurden. Anschließend wurde die Petrischale und die Rekordspritze noch zweimal mit je 10 ml Hanks'-Lösung nachgespült. Die Spülungen wurden ebenfalls in den 25 ml Meßzylinder gegeben. Nach Absetzen der Teilchen wurde die Flüssigkeit von oben her abgesaugt. Der Spülvorgang wurde noch einmal wiederholt.

Jetzt wurde das Frischgewicht des zerkleinerten Pankreas bestimmt und die Collagenase so dazugewogen, daß für 1 g Pankreas 650 uE

Collagenase verwendet wurden. Zum Verdauen des exokrinen Gewebes wurde der 25 ml Meßylinder in ein auf 37 Grd. Celsius thermostatiertes Wasserbad gestellt und mit einem Magnetrührer bei 1100 Umdrehungen pro Minute 2 Minuten lang gerührt. Anschließend wurde mit kleinster Drehzahl weiter gerührt. Nach 12 Minuten wurde die Flüssigkeit in eine kleine Petrischale geleert und mit einer 10 ml Rekordspritze vorsichtig 15 mal aufgesogen und wieder herausgedrückt, sodaß eine homogene, braune Flüssigkeit entstand. Diese wurde in einen eisgekühlten 25 ml Meßzylinder gegeben und mit 20 ml Hanks'-Lösung verdünnt. Nach kurzem Schütteln ließ man die Partikelchen absetzen.

Aufgrund des unterschiedlichen spezifischen Gewichtes des exokrinen Gewebes und der Langerhans'schen Inseln sinken diese schneller. So konnte durch Absaugen des Überstandes ein großer Teil des exokrinen Gewebes abgetrennt werden. Durch erneutes Aufschwemmen und Absitzenlassen wurde der Vorgang mehrmals wiederholt. Unter einem Stereomikroskop wurden die Überstände untersucht und die Inseln mit einer Petersen Mikropipette ausgelesen und in eine eisgekühlte Petrischale mit Hanks'-Lösung überführt. Alle Arbeitsgänge mit Ausnahme des Verdauens von exokrinem Gewebe wurden im Eisbad durchgeführt.

2.6.2. Isolierung der Langerhans'schen Inseln bei foetalen und neugeborenen Ratten.

2.6.2.1. Schnittentbindung

Der mit Ether narkotisierten, schwangeren Ratte wurde durch Längsschnitt vom Becken bis zum Brustbein und Querschnitten am Becken und an den Rippenbögen das Abdomen geöffnet. Danach wurde der Uterus herausgezogen und ausgebreitet. Die Uterushaut wurde bei jedem Foeten vorsichtig aufgeschnitten, der Foet herausgenommen und zuletzt abgenabelt.

2.6.2.2. Entnahme des Pankreas

Die durch Schnitt entbundenen Foeten oder die 5 Tage alten Neugeborenen wurden mit Ether narkotisiert. Das Abdomen wurde an der linken Seite mit einer Schere dort geöffnet, wo man bei den Foeten das Pankreas, bei den Neugeborenen den mit Milch gefüllten Magen als weißen Fleck durch die Haut schimmern sieht. Durch Druck mit 2 Fingern ober- und unterhalb der Öffnung ließen sich Magen, Milz und Pankreas herauspressen. Mit 2 gebogenen, vorne spitzen Pinzetten wurde das Pankreas möglichst vollständig herauspräpariert und in eine Petrischale mit eisgekühlter Hanks'-Lösung gegeben.

Auf diese Weise wurden bei allen Jungen eines Wurfes die Pankreata entnommen. Nach Zerkleinern mit einer Schere wurden die Partikel mit einer 5 ml Rekordspritze in einen kalten 25 ml

Meßzylinder überführt und nach dem Wiegen wie unter 2.6.1. beschrieben weiterbehandelt mit Ausnahme der Verdauungszeiten, die bei Neugeborenen um 1, bei Foeten um 2 Minuten kürzer war.

2.6.3. Vorinkubation der Inseln

Zur Equilibrierung des Stoffwechsels der Inseln nach der Isolierung wurden diese einer Vorinkubation unterzogen. Mit der Petersen Mikropipette wurden sie dazu in ein 5 ml Gläschen überführt und nach Absaugen der Hanks'-Lösung mit 2 ml Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung versetzt. In einem auf 37 Grd. Celsius thermostatierten Schüttelbad wurde das Gläschen unter Carbogenbegasung mäßig geschüttelt. Nach 30 Minuten wurde die Vorinkubation unterbrochen und die Inseln in Hanks'-Lösung gewaschen.

2.6.4. Hauptinkubation der Inseln

Bei allen Versuchen wurden je 20 Inseln mit der Petersen Mikropipette auf den Boden der Netzröhrchen pipettiert und das Netzröhrchen in ein 5 ml Röhrchen mit 15 mm Durchmesser gestellt. In das Röhrchen wurden 1,0 ml Tris-Puffer-Lösung gegeben. In einem auf 37 Grd. thermostatiertem Schüttelbad wurde unter Carbogenbegasung und bei mäßigem Schütteln die Hauptinkubation durchgeführt.

2.6.4.1. Hauptinkubation mit Insulin-Antikörper

Bei den Versuchen mit Insulin-Antikörper war bei der Hauptinkubation der Tris-Puffer-Lösung 16,7 mM Glukose, 0,75% Rinderserumalbumin und Insulin-Antikörper mit einer Bindungkapazität für 4000 uE Insulin zugesetzt. Die Inkubation dauerte 90 Minuten.

2.6.4.2. Hauptinkubation mit Ionophor A 23187 und DIP

Bei den Versuchen mit Ionophor A23187 wurde bei der Hauptinkubation der Tris-Puffer-Lösung 3,0 mM Glukose und 66,6 uM Ionophor A23187 zugesetzt. Diesem Inkubationsmedium wurde bei den Untersuchungen mit DIP noch 0,1 mM DIP zugegeben. Die Inkubation dauerte 90 Minuten.

2.6.4.3. Hauptinkubation mit Inseln von foetalen, neugeborenen, erwachsenen oder 2 Jahre alten Ratten

Bei den Untersuchungen der 45-Calciumaufnahme in Inseln der unterschiedlich alten Ratten wurden in einem Versuch nur Inseln einer Ratte bzw. bei Foeten und neugeborenen eines Wurfes verwendet. Den 20 Inseln eines Netzröhrchens wurden 1,0 ml Tris-Puffer-Lösung zupipettiert, die 3,0 oder 16,7 mM Glukose und 0,75 % Rinderserumalbumin enthielt. Die Hauptinkubation dauerte 7,5, 15, 30 oder 90 Minuten.

2.6.4.4. Hauptinkubation mit reduziertem Glutation

Für die Versuche, bei denen zusätzlich noch GSH eingesetzt wurde, wurden je 20 Inseln wie unter 2.6.4. beschrieben auf die Netze gebracht und in die 5 ml Gläschen gestellt, die 0,9 ml Tris-Puffer-Lösung enthielten. Dem Hauptinkubationsmedium waren 0,75% Rinderserumalbumin, 3,0 oder 16,7 mM Glukose aber kein GSH zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten, in der sich die Inseln an die Temperatur und das Medium akklimatisieren konnten, wurde die Schüttelmaschine gestoppt. Nun wurden 0,1 ml Tris-Puffer-Lösung dazupipettiert, die frisch aufgelöstes Glutathion in einer Konzentration von 1 mM enthielt, sodaß sich eine GSH-Konzentration von 0,1 mM ergab. Den Vergleichsproben wurde 0,1 ml Tris-Puffer-Lösung ohne GSH zugegeben. Anschließend wurde normal 7,5, 15 oder 30 Minuten bei mäßigem Schütteln und unter Carbogenbegasung inkubiert.

2.6.4.5. Hautinkubation mit oxidiertem Glutathion

Bei den Versuchen mit oxidiertem Glutathion wurden genauso verfahren wie unter 2.6.4.4. bei reduziertem Glutathion beschrieben. Nur enthielt die nach 5 Minuten zugesetzte Tris-Puffer-Lösung anstatt der 1 mM GSH 0,5 mm GSSG. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten.

2.6.5. Lanthanfixierung

Bei der Bestimmung des intrazellulären Calcium-Gehaltes durch Messung der ß-Strahlung von 45-Calcium tritt das Problem auf, daß in einem nicht radioaktiv verseuchten Medium gemessen werden muß und kein 45-Calcium außen an den Inseln mehr haften sollte, da sonst zu hohe Ergebnisse erhalten werden. Damit während der Spühlung kein 45-Calcium die Zellen durch die Calcium-Kanäle verlassen kann, müssen diese blockiert werden. Van Breemen et al. (1972) fanden, daß dreiwertige Lanthanionen die Calciumfluxe durch die Membran von Muskelzellen aufgrund seiner höheren Ladung nahezu vollständig hemmt und auf der Oberfläche haftendes Calcium verdrängt. Hellman et al. (1976) wendeten diese Methode bei isolierten Inseln von ob-ob-Mäusen an und zeigten, daß durch Lanthanionen (2 mM) sowohl der Influx als auch der Efflux von 45-Calciumionen gehemmt wird. Bei einer Reihe von Untersuchungen mit der Lanthanfixiermethode konnten Hellman et al. (1977) zeigen, daß bei der Messung des sogenannten Lanthan-non-displaceable Calciums der Calciumpool erfaßt wird, der für die Insulinsekretion entscheidend ist. Sie fanden mit ihren Ergebnissen Übereinstimmung mit anderen Autoren (Zentrifugation durch Ölschicht: Malaisse et al. 1978). Durch Herabsetzen der Mediumstemperatur auf 1 Grd. Celsius (Hellman, 1978) konnte die Hemmung noch verbessert werden, was dadurch erklärt wird, daß bei dieser Temperatur der energieverbrauchende Calcium-Efflux zum Erliegen kommt, da kein Substrat mehr zur Verfügung gestellt werden kann. Flatt et al. (1980 a) wiesen nach, daß La-3+ die

Calcium-Kanäle reversibel blockiert und das unspezifisch an der Membran haftende Calcium kompetitiv verdrängt, nicht aber in das Zellinnere eindringt. Weiterhin wies er (Flatt et al. 1980 b) nach , daß La^{3+} aufgrund seines dem Ca^{2+} sehr ähnlichen Ionenradius von allen Lanthaniden am besten geeignet ist.
Somit ist es einleuchtend, daß diese einfache, sehr genaue Methode für eigene Versuche übernommen wurde.

Nach der Hauptinkubation wurden die Netzröhrchen sofort in 5 ml Röhrchen mit 15 mm Durchmesser gestellt, die jeweils 1 ml eisgekühlte Tris-Puffer-Lösung mit 2 mM Lanthanchlorid (2.5.3.) enthielten. Nach 10 Minuten wurden die Netzröhrchen in neue 5 ml Röhrchen, die ebenfalls 1 ml Tris-Puffer-Lösung mit 2 mM Lanthanclorid enthielten, gestellt und mehrmals von Hand geschüttelt.
Nach weiteren 50 Minuten wurden die Netzröhrchen wieder herausgenommen und zur Messung vorbereitet.

2.6.6. Vorbereiten der Proben zur Messung

Nach der Lanthanfixierung wurden die Netze von ihren Röhrchen mit einer Pinzette abgezogen und jedes für sich in ein Szintillationsfläschchen überführt. Auf jedes Netz wurden danach 20 ul Hyaminlösung pipettiert, um die Inseln aufzulösen. Anschließend wurden die Szintillationsfläschchen mit 16 ml Unisolve I gefüllt. Nach kurzem, starkem Schütteln und 2 Minuten Stehenlassen wurde die Unisolvelösung in ein anderes Szintillatorfläschchen dekantiert, ohne daß das Netz mitüberführt wurde.
Nach mindestens zweistündiger Ruhezeit unter Lichtabschluß wurde die Unisolvelösung im ß-Counter bei völlig geöffnetem Fenster gemessen. Es wurde hierbei eine Meßdauer von 10 Minuten pro Probe gewählt, damit mehr als 1000 Counts gezählt wurden und so die Meßgenauigkeit über 97% lag.

2.6.7. Bestimmung des Backgrounds

Um den Einfluß der Lösungen, Reagenzien und Gefäße auf die Meßergebnisse möglichst gut zu eliminieren, wurden bei jedem Versuch einige Netzröhrchen ohne Inseln genauso der Hauptinkubation und der Lanthanfixierung unterzogen wie die Proben. Die mit diesen Leernetzen erhaltenen Werte ergaben den Background.

2.6.8. Bestimmung des Thiolgehaltes.

Zur Messung des Gehaltes von reduziertem Glutathion in Tris-Puffer-Lösung wurde die von Cikryt (1979) modifizierten Methode nach Ellman (1959) angewendet. Die Bestimmung beruht auf einer Reduktion von DTNB (Ellman's Reaganz) und der Extinktionsmessung des gelben Anions.

Es wurde wie unter 2.6.4.4. beschrieben eine Hauptinkubation mit Tris-Puffer-Lösung, die 3 mM Glukose, 0,1 mM GSH und 0,75% Albumin enthielt, durchgeführt, allerdings mit leeren Netzen ohne Inseln. Nach 0, 7,5, 15 und 30 Minuten wurde jeweils eine Probe von 0,1 ml entnommen und mit 0,4 ml eisgekühltem Ellman's Reaganz versetzt. 15 Minuten später erfolgte die Messung der Extinktion bei 412 nm und Raumtemperatur gegen einen gleich behandelten Reagenzienleerwert. Der Meßwert in der nullten Minute wurde als 100% gesetzt, die weiteren Meßwerte eines Röhrchens dann als Anteil des ersten Wertes berechnet.

2.7. Berechnung und Statistik der Meßergebnisse mit 45-Calcium

2.7.1. Umrechnung der Meßwerte auf das Kalibrierungsdatum

Da 45-Calcium mit einer Halbwertszeit von 164 Tagen zerfällt und deshalb die Aktivität stetig abnimmt, müssen die Meßergebnisse, damit man sie miteinander vergleichen kann, auf einen Bezugstag umgerechnet werden. Dies kann nach dem Zerfallsgesetz

$$N(0) = N(t) \times e^{-k \times t}$$

geschehen, wobei N(0) die Aktivität am Bezugstag, N(t) die Aktivität am Meßtag, k die Zerfallskonstante für 45-Calcium und t die Anzahl der Tage zwischen Bezugs- und Meßtag sind. Als Bezugstag wurde das von Amersham-Buchler angegebene Kalibrierungsdatum genommen, für das auch die Aktivität pro ml 45-Calciumchlorid-Lösung angegeben war.

Da die von der Firma gelieferten Lösungen nicht immer die gleiche Aktivität pro ml hatten, wurden die Meßergebnisse weiterhin so umgerechnet, daß am Kalibrierungstag eine Aktivität von 20 uCi/ml vorliegt. So ließen sich Ergebnisse verschiedener Tage und verschiedener Lösungen miteinander vergleichen.

2.7.2. Bestimmung des Backgrounds und dessen Einbeziehung in die Ergebnisse der Proben.

Wie unter 2.6.8. beschrieben wurden bei jedem Versuch auch einige Leernetze ohne Inseln zur Bestimmung des Backgrounds gemessen. Der Durchschnitt aller Backgroundwerte einer Versuchsserie wurde

von den jeweiligen Versuchsergebnissen abgezogen, bevor eine Umrechnung von Counts pro Minute in fmol 45-Calcium stattfand. Dabei wurde darauf geachtet, daß mindestens soviele Leerwerte pro Versuchsserie gemessen wurden, daß der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der Leernetze weniger als 20% des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) der Proben betrug.

2.7.3. Bestimmung der Efficiency des Counters.

Da bei dem Meßverfahren nicht alle radioaktiven Zerfälle vom Gerät registriert werden, mußte die Meßgenauigkeit bestimmt werden. Deshalb wurde eine bekannte Aktivitätsmenge 45-Calcium im Counter gemessen und die angezeigten Impulse pro Minute (CpM) mit der errechneten Anzahl der tatsächlichen Zerfälle pro Minute (DpM) verglichen. Es wurde bei dem von uns verwendeten Gerät eine Efficiency von 95% bestimmt, sodaß alle Werte zur Umrechnung von CpM in DpM mit dem Faktor 1,05263 multipliziert werden müssen.

2.7.4. Umrechnung von DpM in fmol 45-Calcium.

Nimmt man von der Formel zur Berechnung der spezifischen Aktivität

$$R = (k \times L) : (A \times I),$$

wobei R die spezifische Aktivität pro Gramm radioaktiver Substanz, k die Zerfallskonstante, L die Loschmidsche Zahl, A die Atommasse und I die Aktivität in Becquerel (Bq) sind, den

Kehrwert, so läßt sich aus einer gegebenen Aktivität die dazugehörige Masse berechnen. Teilt man das Ergebnis noch durch das Atomgewicht, so erhält man die Massenangabe anstatt in Gramm in Mol.

Der Kehrwert aus dem Produkt von Zerfallskonstante und Loschmidscher Zahl ergibt für 45-Calcium 0,0339434 fmol x Sekunde. 1 Bq entspricht daher 0,0339434 fmol 45-Calcium. Da die Efficiency 95% betrug und die Ergebnisse nicht in Impulsen pro Sekunde sondern pro Minute gemessen wurden, ergab sich letztendlich ein Umrechnungsfaktor von 2,14379 fmol x Minute.

Es mußten also die auf den Kalibrierungstag berechneten CpM mit dem Faktor 2,14379 multipliziert werden, um das Ergebnis in fmol 45-Calcium zu erhalten.

2.7.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Es werden grundsätzlich die Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der Standardfehler des Mittelwertes errechnet sich aus der in den Tabellen angegebenen Anzahl (n) von Versuchen.

Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der t-Test nach Student herangezogen, wobei ein t-Test mit $p < 0,05$ als signifikant bewertet wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ermittlung der Aufnahme von 45-Calcium in Langerhanssche Inseln in Gegenwart von Glukose und Insulin-Antikörper

Es wurde untersucht, ob bei maximaler Stimulation durch Glukose (20 mM) der Calciuminflux durch Insulin-Antikörper beeinflußt werden kann. Da bei 20 Inseln und einer Inkubationsdauer von 90 Minuten mit einer Insulinsekretion von sicher weniger als 4000 uE gerechnet werden muß, wurde soviel Insulin-Antikörper zugesetzt, daß mindestens 4000 uE Insulin gebunden werden.
Es ergab sich dabei ohne Insulin-Antikörper eine Aufnahme von 541,7 + 53,5 fmol 45-Calcium pro 20 Inseln. Bei gleichen Bedingungen, aber unter Zusatz von Insulin-Antikörper, zeigte sich eine 45-Calciumaufnahme von 472,5 + 37,0 fmol pro 20 Inseln (Tabelle 1 und Abbildung 1). Beide Werte zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2. Einfluß von Ionophor A 23187 und DIP auf die 45-Calcium-aufnahme in Langerhanssche Inseln

3.2.1. Erstellen der Methode

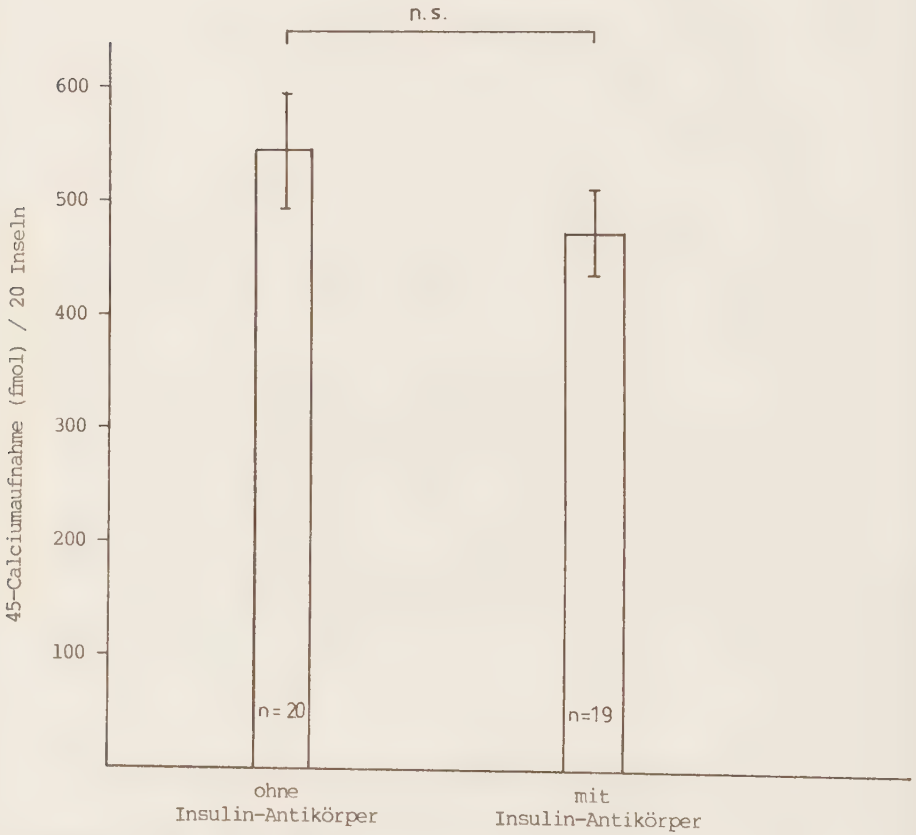
Bei Zusatz von 100 umol/l Ionophor A 23187 zum Inkubationsmedium zeigte sich, daß die Werte der Leernetze, die zur Bestimmung des Backgrounds dienen, über das Dreifache anstiegen, wodurch eine

Tabelle 1: Ermittlung der Aufnahme von 45-Calcium in Langerhanssche Inseln in Gegenwart von Glukose und Insulin-Antikörper

Insulin-Antikörper	Glukose mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
0	3,0	290,1 + 25,4	(39)	
0	16,7	541,7 + 53,5	(20)	< 0,001
4000	16,7	472,5 + 37,0	(19)	n.s.

20 Inseln wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Bei einem Teil der Versuche war dem Medium Insulin-Antikörper mit einer Bindungskapazität von 4000 uE zugesetzt.

Abbildung 1: Ermittlung der durch Glukose induzierten 45-Calciumaufnahme in Langerhannssche Inseln bei Zugabe von Insulin-Antikörper.



20 Inseln wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Bei einem Teil der Versuche war dem Medium Insulin-Antikörper mit einer Bindungskapazität von 4000 uE zugesetzt.

Auswertung der Calciumaufnahme der Inseln nicht mehr möglich war. Bei Verwendung von Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung anstatt Tris-Puffer-Lösung ergaben sich 20 mal höhere Leerwerte als mit Tris-Puffer-Lösung, die Schwankungen bis zum Dreifachen aufwiesen. Daher wurde versucht mit niedrigeren Ionophor-Konzentrationen zu arbeiten.

Wie sich aus Tabelle 2 und Abbildung 2 erkennen läßt, liegt bei einer Ionophorkonzentration von 66,6 uM der Leerwert bei 240 + 30 CpM/Netz. Die Netze ohne Ionophor A 23187 ergaben zwar einen niedrigeren Wert von 142 + 16 CpM/Netz, aber der Unterschied liegt noch in einem akzeptablen Bereich, sodaß für weitere Versuche, bei denen eine möglichst hohe Ionophor-Konzentration vorliegen sollte, 66,6 uM gewählt wurde.

3.2.2. Einfluß von DIP auf die durch Ionophor A 23187 hervorgerufene Aufnahme von 45-Calcium in Langerhanssche Inseln

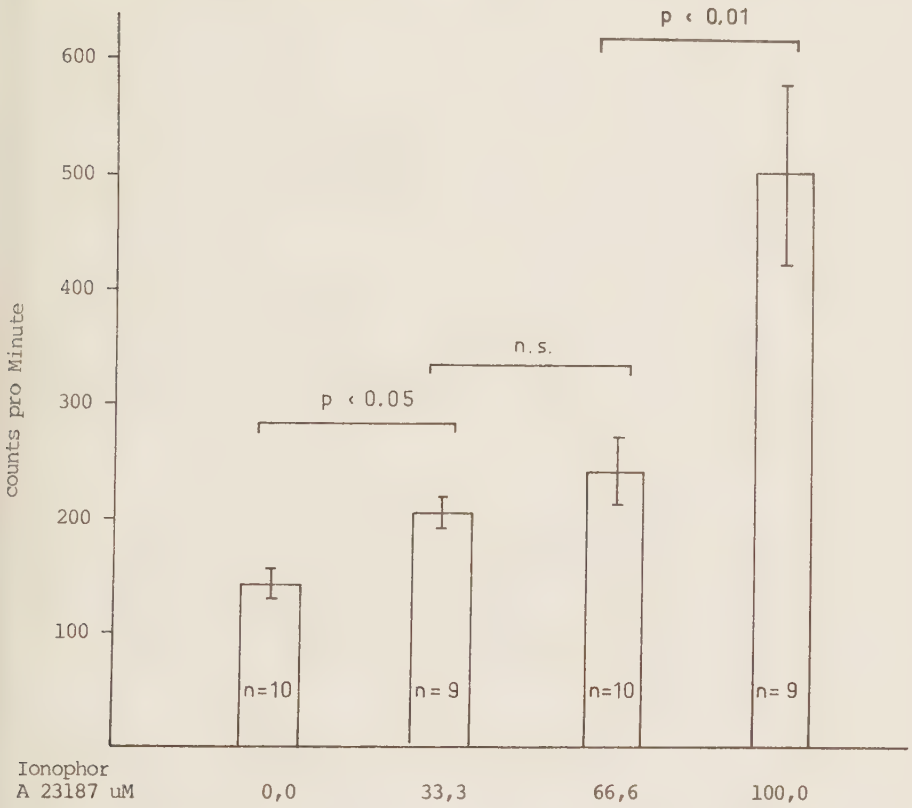
Bei substimulatorischer Glukosekonzentration (3,0 mM) wurde die 45-Calciumaufnahme durch Ionophor A 23187 in 90 Minuten untersucht. 66,6 uM Ionophor A 23187 erhöhten die 45-Calciumaufnahme in 20 Inseln signifikant ($p < 0,02$) von 290,1 + 25,4 fmol auf 633,6 + 72,2 (Tabelle 3 und Abbildung 3). Weiterhin wurde untersucht, ob DIP in einer Konzentration von 0,1 mM die durch den Ionophor hervorgerufene Steigerung der 45-Calciumaufnahme verändern kann. Hier zeigte sich, daß 0,1 mM DIP die 45-Calciumaufnahme nicht signifikant beeinflußte.

Tabelle 2: Leerwerte der 45-Calcium-Bestimmung in Abhängigkeit der Konzentration von Ionophor A 23187

A 23187 uM	Leerwert CpM/Netz	n	p
0,0	142 + 16	(10)	
			< 0,05
33,3	201 + 14	(9)	
			n.s.
66,6	240 + 14	(10)	
			< 0,01
100,0	507 + 82	(9)	

Ein Leernetz wurde bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 90 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium wurden verschiedene Konzentrationen von Ionophor A 23187 zugesetz.

Abbildung 2: Leerwerte der 45-Calcium-Bestimmung in Abhängigkeit der Konzentration von Ionophor A 23187



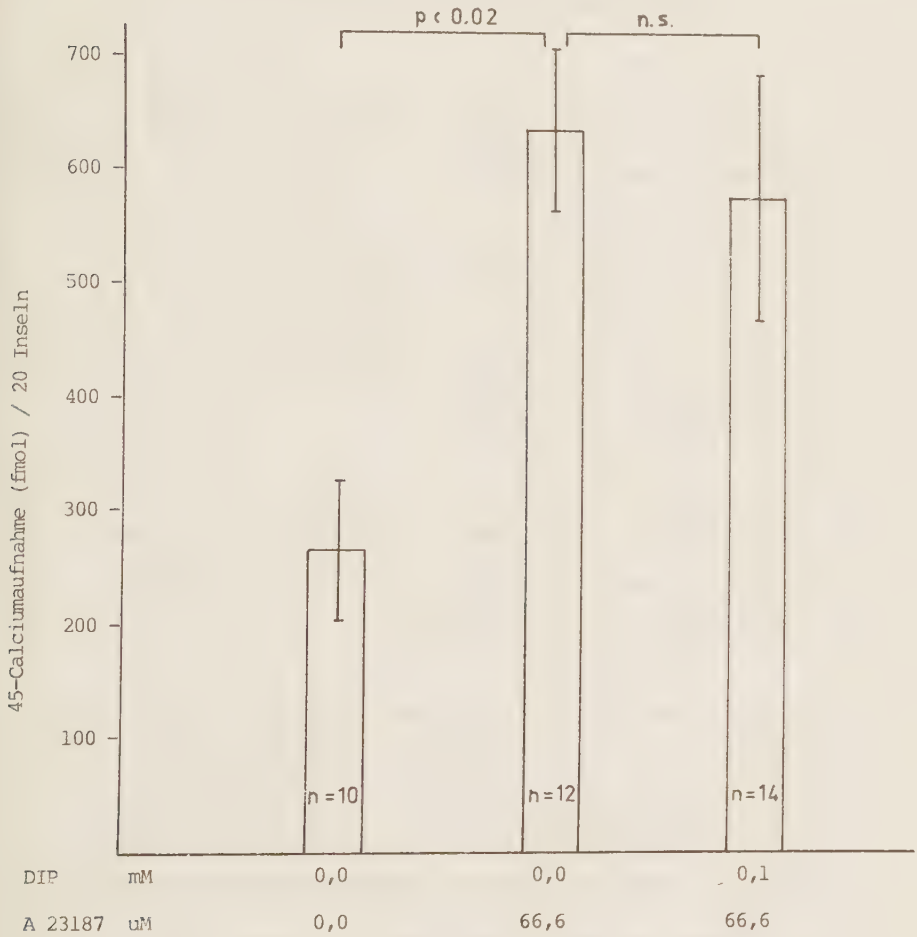
Ein Leernetz wurde bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 90 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium wurden verschiedene Konzentrationen von Ionophor A 23187 zugesetz.

Tabelle 3: Einfluß von DIP auf die durch Ionophor A 23187 hervorgerufene 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln.

A 23187 uM	DIP mM	Glukose mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
0,0	0,0	3,0	263,5 + 60,3	(10)	
66,6	0,0	3,0	633,6 + 72,2	(12)	< 0,02
66,6	0,1	3,0	576,3 + 110,4	(14)	n.s.

20 Inseln wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 90 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,0 bzw. 66,6 uM Ionophor A 23198 und 0,1 mM DIP zugesetzt.

Abbildung 3: Einfluß von DIP auf die durch Ionophor A 23187 hervorgerufene 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln.



20 Inseln wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 90 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,0 bzw. 66,6 uM Ionophor A 23198 und 0,1 mM DIP zugesetzt.

3.3. Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhanssche Inseln erwachsener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Sowohl mit substimulatorischer (3,0 mM) als auch mit stimulatorischer (16,7 mM) Glukosekonzentration wurde die 45-Calciumauf- nahme in Langerhanssche Inseln erwachsener Ratten bei 7,5, 15, 30 und 90 Minuten Inkubationszeit gemessen. Der Unterschied der 45-Calciumaufnahme bei 3,0 mM und 16,7 mM Glukose ist schon nach 7,5 Minuten mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ deutlich zu sehen und wird bei längeren Inkubationszeiten immer markanter (Tabelle 4 und Abbildung 4).

3.4. Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhanssche Inseln foetaler Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

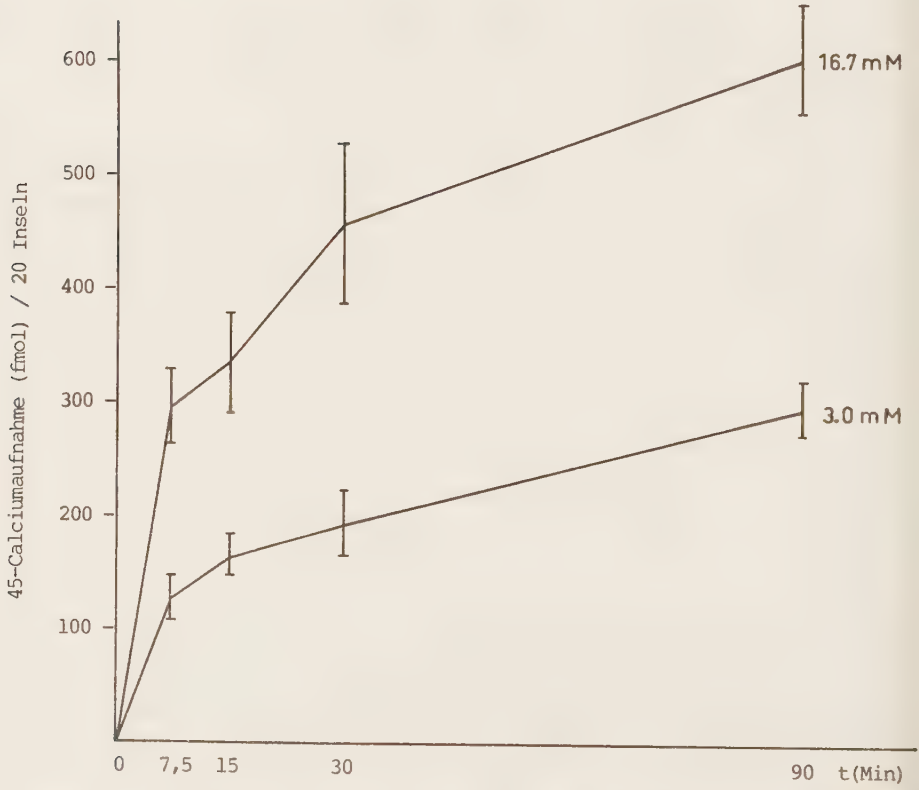
Genauso wie bei den Inseln erwachsener Ratten wurde auch bei den Inseln von Foeten die 45-Calciumaufnahme mit 3,0 mM und 16,7 mM Glukose nach 15, 30 und 90 Minuten untersucht. Hierbei zeigte sich, daß durch längere Inkubationszeiten die 45-Calciumaufnahme praktisch nicht erhöht wurde und daß stimulatorische Glukose keine Steigerung des Influxes gegenüber substimulatorischer Glukosekonzentration bewirkte. Die Ergebnisse sind Tabelle 5 und Abbildung 5 dargestellt.

Tabelle 4: Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calciumaufnahme Langerhanssche Inseln erwachsener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Inkubations-zeit Min.	Glukose mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
7,5	3,0	126,8 + 22,2	(12)	
7,5	16,7	294,8 + 34,8	(12)	< 0,01
15	3,0	160,4 + 20,6	(19)	
15	16,7	330,4 + 44,6	(22)	< 0,01
30	3,0	186,7 + 27,9	(15)	
30	16,7	453,3 + 57,0	(16)	< 0,01
90	3,0	290,1 + 39,1	(39)	
90	16,7	595,2 + 49,7	(39)	< 0,001

20 Inseln von erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert.

Abbildung 4: Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhanssche Inseln erwachsener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose



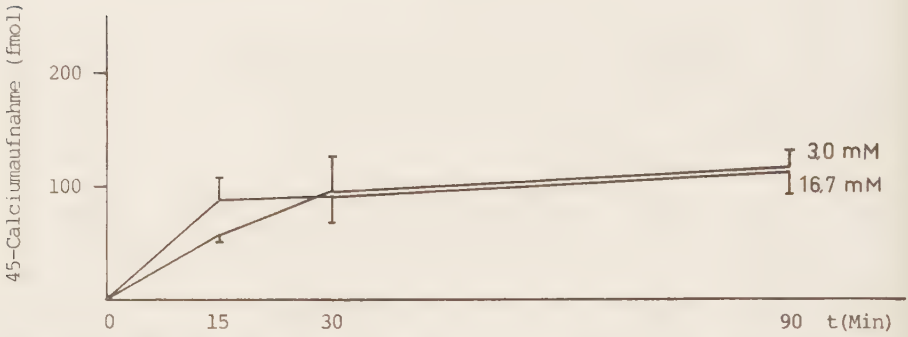
20 Inseln von erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogen-begasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 7,5, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert.

Tabelle 5: Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calciumaufnahme Langerhanssche Inseln foetaler Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Inkubations-zeit Min.	Glukose mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	3,0	55,6 + 8,1	(18)	n.s.
15	16,7	87,4 + 18,9	(16)	
30	3,0	96,7 + 34,2	(12)	n.s.
30	16,7	91,0 + 23,0	(13)	
90	3,0	112,3 + 15,1	(22)	n.s.
90	16,7	107,4 + 17,6	(21)	

20 Inseln von foetalen Rattenwurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert.

Abbildung 5: Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhanssche Inseln foetaler Ratten in Gegenwart 3,0 und 16,7 mM Glukose



20 Inseln von foetalen Rattenwurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogen-begasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert.

3.5. Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhanssche Inseln neugeborener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Auch bei Inseln von 5 Tage alten Ratten wurde der Einfluß von 3,0 mM bzw. 16,7 mM Glukose auf die 45-Calciumaufnahme innerhalb 15, 30 und 90 Minuten untersucht. Wie aus Tabelle 6 und Abbildung 6 sichtbar ist, steigert die stimulatorische Glukosekonzentration die 45-Calciumaufnahme bei jeder Inkubationszeit signifikant. Auch wird durch Verlängern der Inkubationszeit bei stimulatorischer Glukosemenge der Calciuminflux deutlich gesteigert, während bei substimulatorischer Glukosekonzentration von der 30. zur 90. Minute fast keine Erhöhung zu sehen ist.

3.6. Vergleich der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von erwachsenen, foetalen und neugeborenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

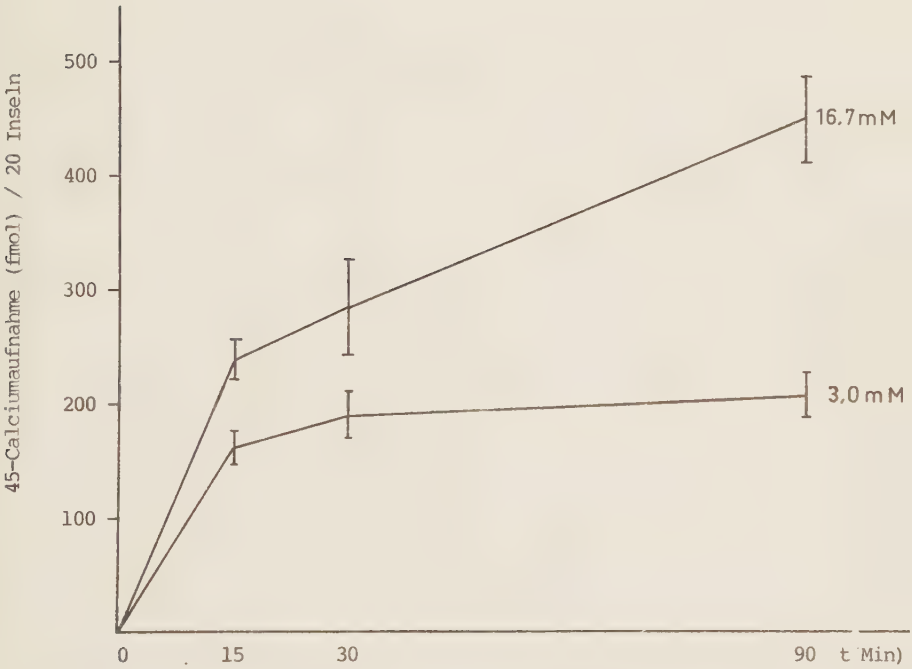
Bei der Untersuchung der 45-Calciumaufnahme mit 3,0 mM Glukose bei Inseln erwachsener, foetaler und neugeborener Ratten zeigte sich, daß der Influx bei den Foeten deutlich geringer war als bei den 5 Tage alten Ratten (15 Min: $p < 0,01$; 30 Min: $p < 0,05$; 90 Min: $p < 0,01$). Zwischen Erwachsenen und Neugeborenen zeigte sich ein Unterschied erst bei 90 Minuten Inkubationszeit mit einer Signifikanz von $p < 0,02$. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und Abbildung 7 dargestellt.

Tabelle 6: Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calciumaufnahme Langerhanssche Inseln neugeborener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Inkubationszeit Min.	Glukose mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	3,0	127,0 + 15,1	(22)	n.s.
15	16,7	239,2 + 19,7	(26)	
30	3,0	190,1 + 21,0	(19)	< 0,05
30	16,7	283,8 + 42,7	(16)	
90	3,0	205,8 + 19,9	(52)	< 0,001
90	16,7	448,0 + 39,1	(55)	

20 Inseln von 5 Tage alten Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert.

Abbildung 6: Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhanssche Inseln neugeborener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose



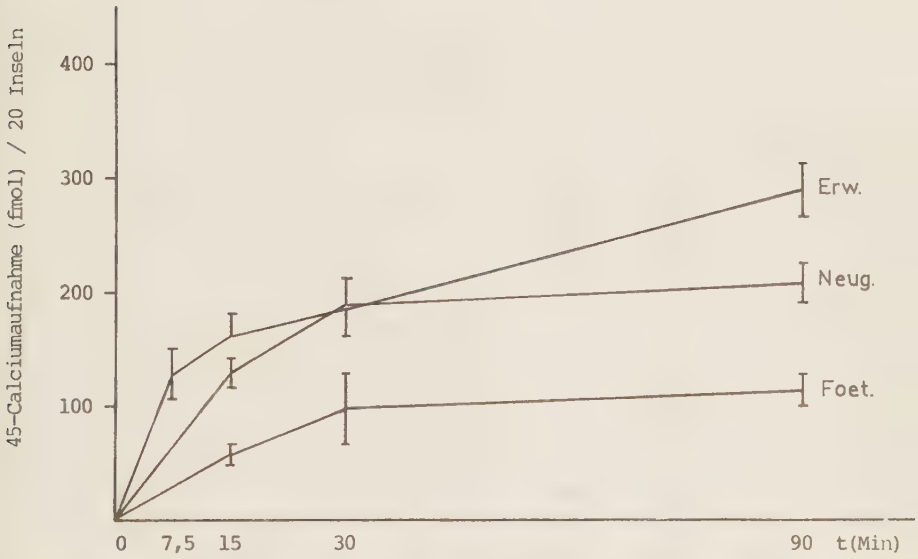
20 Inseln von 5 Tage alten Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert.

Tabelle 7: Vergleich der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsen Ratten in Gegenwart von 3,0 mM Glukose

Zeit Min	Alters-stufe	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	Foet	55,6 + 8,1	(18)	
				< 0,01
15	Neug	127,0 + 15,1	(22)	
				n.s.
15	Erw	160,4 + 20,6	(19)	
30	Foet	96,7 + 34,2	(12)	
				< 0,05
30	Neug	190,1 + 21,0	(19)	
				n.s.
30	Erw	186,7 + 27,9	(15)	
90	Foet	112,3 + 15,1	(22)	
				< 0,01
90	Neug	205,8 + 19,9	(52)	
				< 0,02
90	Erw	290,1 + 25,4	(39)	

20 Inseln von foetalen, 5 Tage alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert.

Abbildung 7: Vergleich der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsen Ratten in Gegenwart von 3,0 mM Glukose



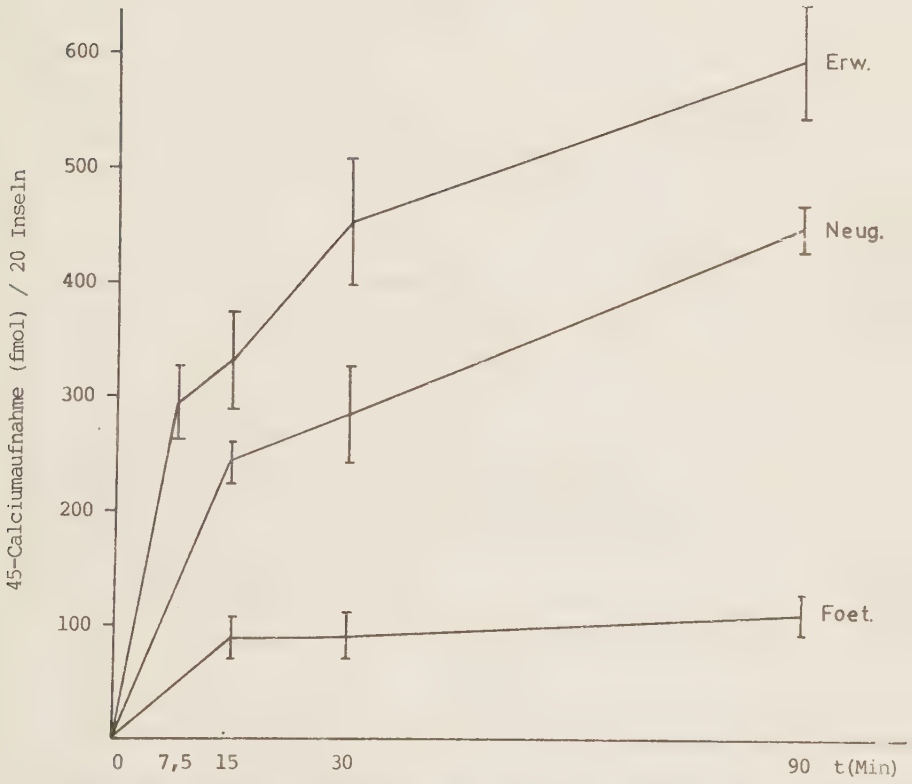
20 Inseln von foetalen, 5 Tage alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert.

Tabelle 8: Vergleich der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsen Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glukose

Zeit Min	Alters-stufe	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	Foet	87,4 + 18,9	(16)	
				< 0,001
15	Neug	239,2 + 19,7	(26)	
				n.s.
15	Erw	330,4 + 44,6	(22)	
30	Foet	91,0 + 23,0	(13)	
				< 0,01
30	Neug	283,8 + 42,7	(16)	
				< 0,05
30	Erw	460,3 + 72,1	(12)	
90	Foet	107,4 + 17,6	(21)	
				< 0,001
90	Neug	448,0 + 39,1	(55)	
				< 0,01
90	Erw	595,2 + 49,7	(39)	

20 Inseln von foetalen, 5 Tage alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 16,7 mM Glukose inkubiert.

Abbildung 8: Vergleich der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsen Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glukose



20 Inseln von foetalen, 5 Tage alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 16,7 mM Glukose inkubiert.

Bei stimulatorischer Glukosekonzentration (Tabelle 8 und Abbildung 8) wurde der Unterschied in der Calciumaufnahme zwischen den Foeten und den Neugeborenen wesentlich größer. So betrug bei 15 Minuten die 45-Calciumaufnahme der neugeborenen Rat- ten das zweieinhalbfache ($p < 0,001$), bei 30 Minuten das dreifache ($p < 0,01$) und bei 90 Minuten das vierfache ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Foeten. Auch zwischen Erwachsenen und Neugeborenen war der Unterschied deutlicher als mit substimulatorischer Glukose (30 Min: $p < 0,05$; 90 Min: $p < 0,01$).

3.7. Einfluß von oxidiertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

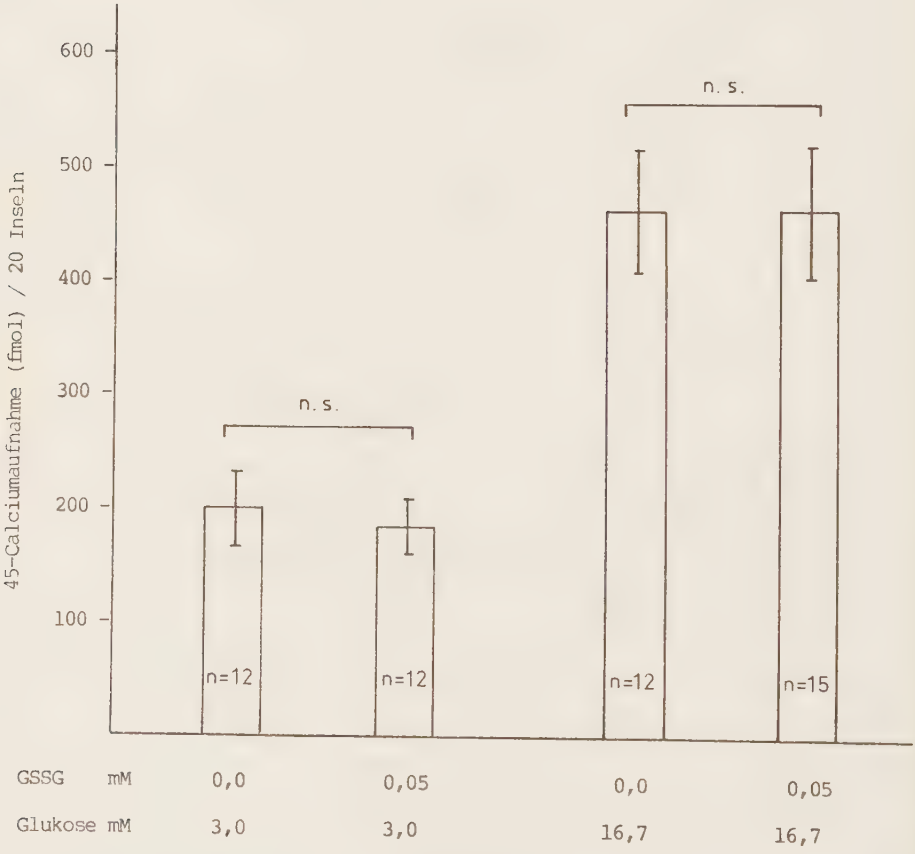
Um Untersuchungen mit reduziertem Glutathion durchführen zu können, mußte zuerst bestimmt werden, ob die oxidierte Form einen Einfluß auf den Calciuminflux hat, da sich GSH ziemlich schnell in wässriger Lösung zu GSSG umsetzt. Da das oxidierte Glutathion fast das doppelte Molekulargewicht hat (MG ox.: 612, MG red.: 314) wurde eine Konzentration von 0,05 mM gewählt. Es zeigte sich nun, daß sowohl bei substimulatorischer Glukose (3,0 mM) als auch bei stimulatorischer Glukose (16,7 mM) die 45-Calciumaufnahme durch GSSG nicht verändert wurde (Tabelle 9, Abbildung 9).

Tabelle 9: Einfluß von oxidiertem Glutathion auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhansscher Inseln von erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Glukose mM	GSSG mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
3,0	0,0	199,2 + 32,1	(12)	n.s.
3,0	0,05	182,2 + 26,2	(12)	
16,7	0,0	462,4 + 54,2	(12)	n.s.
16,7	0,05	461,2 + 58,1	(15)	

20 Inseln von erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 30 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,05 mM GSSG zugesetzt.

Abbildung 9: Einfluß von oxidiertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose



20 Inseln von erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 30 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,05 mM GSSG zugesetzt.

3.8. Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhansscher Inseln von erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose.

3.8.1. Bestimmung der Stabilität von reduziertem Glutathion im Inkubationsmedium.

Da aus unserem Arbeitskreis bekannt war, daß reduziertes Glutathion in wässriger Lösung oxidiert wird, war es notwendig vor den Versuchen mit Inseln zu untersuchen, wieviel GSH zu welchem Zeitpunkt noch in der Tris-Puffer-Lösung vorhanden ist. Bei diesen Untersuchungen mit Leernetzen zeigte sich, daß nach 15 Minuten noch 78,6 + 3,20 % und nach 30 Minuten noch 59,4 + 2,95 % des reduzierten Glutathions gemessen wurde im Vergleich zu der Messung in der nullten Minute (Tabelle 10 und Abbildung 10).

3.8.2. Bestimmung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln bei Zusatz von reduziertem Glutathion.

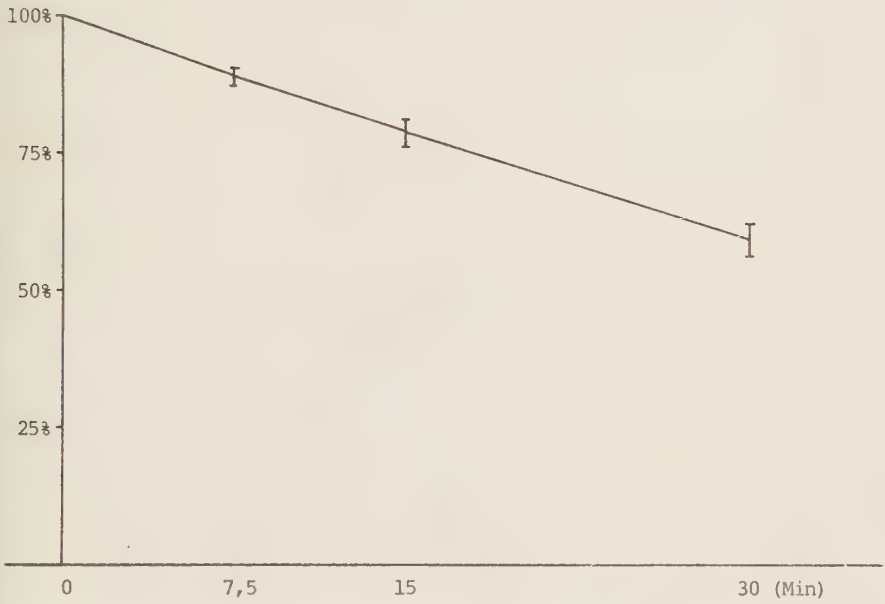
Es wurde sowohl bei substimulatorischer als auch bei stimulatorischer Glukosekonzentration untersucht ob 0,1 mM GSH den Calciuminflux verändern kann. Bei 7,5 Minuten Inkubationszeit konnte bei beiden Glukosekonzentrationen kein durch GSH hervorgerufener Unterschied in der 45-Calciuaufnahme gefunden werden. Bei 15 Minuten Inkubationszeit zeigte sich bei 3,0 mM Glukose eine Steigerung von 160,4 + 20,6 fmol 45-Calcium auf 259,6 + 31,8 fmol 45-Calcium ($p < 0,02$) und bei 16,7 mM Glukose

Tabelle 10: Bestimmung der Stabilität von reduziertem Glutathion im Tris-Puffer-lösung.

Inkubations-Zeit (Min)	GSH Stabilität	n
0,0	100 %	(4)
7,5	88,8 + 2,1 %	(4)
15	78,6 + 3,2 %	(4)
30	59,4 + 2,9 %	(4)

Ein Leernetz wurde unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75% Rinderserumalbumin, 0,1 mM GSH und 3,0 mM Glukose enthielt, Inkubiert. Zum Zeitpunkt 0, 7,5, 15 und 30 Minuten wurde eine Probe von 0,1 ml entnommen und die GSH-Konzentration bestimmt. Es wird die noch vorhandene GSH-Konzentration im Vergleich zur nullten Minute angegeben.

Abbildung 10: Bestimmung der Stabilität von reduziertem Glutathion im Tris-Puffer-lösung.



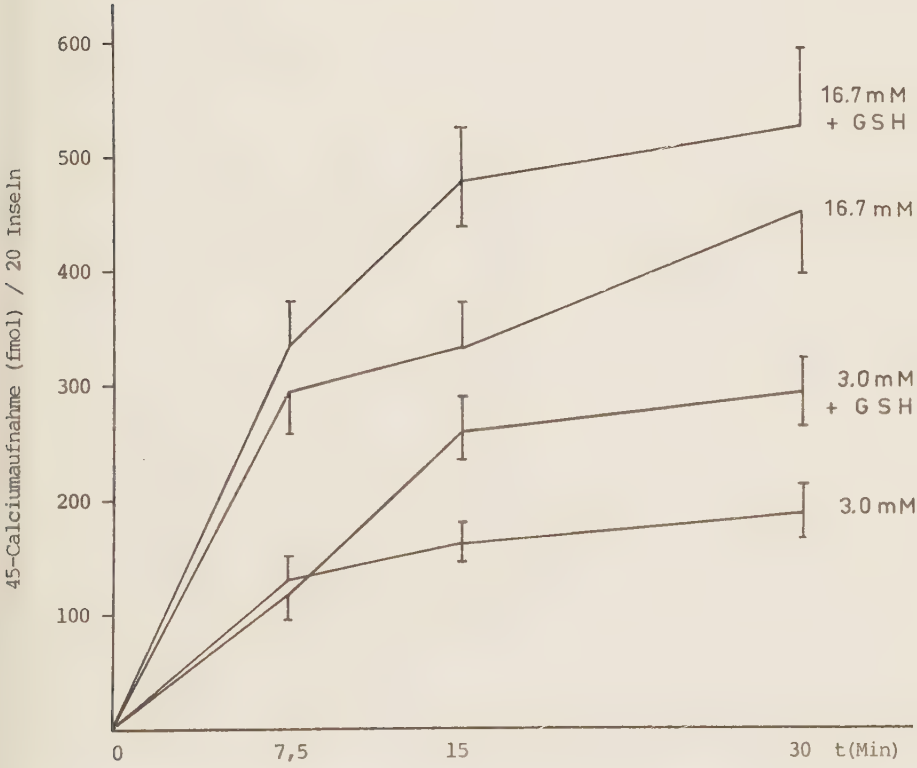
Ein Leernetz wurde unter Carbogenbegasung in 1,0 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75% rinderserumalbumin, 0,1 mM GSH und 3,0 mM Glukose enthielt, Inkubiert. Zum Zeitpunkt 0, 7,5, 15 und 30 Minuten wurde eine Probe von 0,1 ml entnommen und die GSH-Konzentration bestimmt. Es wird die noch vorhandene GSH-Konzentration im Vergleich zur nullten Minute angegeben.

Tabelle 11: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Zeit Min	Glukose mM	GSH mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
7,5	3,0	0,0	126,8 + 22,2	(12)	
7,5	3,0	0,1	113,2 + 18,3	(12)	n.s.
7,5	16,7	0,0	294,8 + 34,8	(9)	
7,5	16,7	0,1	337,3 + 31,8	(11)	n.s.
15	3,0	0,0	160,4 + 20,6	(19)	
15	3,0	0,1	259,6 + 31,8	(22)	< 0,02
15	16,7	0,0	330,4 + 44,6	(22)	
15	16,7	0,1	481,9 + 44,4	(23)	< 0,05
30	3,0	0,0	186,7 + 27,9	(15)	
30	3,0	0,1	291,5 + 31,1	(16)	< 0,05
30	16,7	0,0	453,3 + 57,0	(16)	
30	16,7	0,1	525,3 + 70,0	(20)	n.s.

20 Inseln von erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 11: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose



20 Inseln von erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 7,5, 15 und 30 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

von 330,4 + 44,6 fmol 45-Calcium auf 481,9 + 44,4 fmol 45-Calcium ($p < 0,05$). Wurde 30 Minuten inkubiert, war eine durch GSH hervorgerufene Steigerung des Calciuminfluxes bei 3,0 mM Glukose sichtbar ($p < 0,05$), während sie bei 16,7 mM Glukose nur vermutet werden kann. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 und Abildung 11 dargestellt.

3.9. Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calcium-aufnahme Langerhansscher Inseln von foetalen und neugeborenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

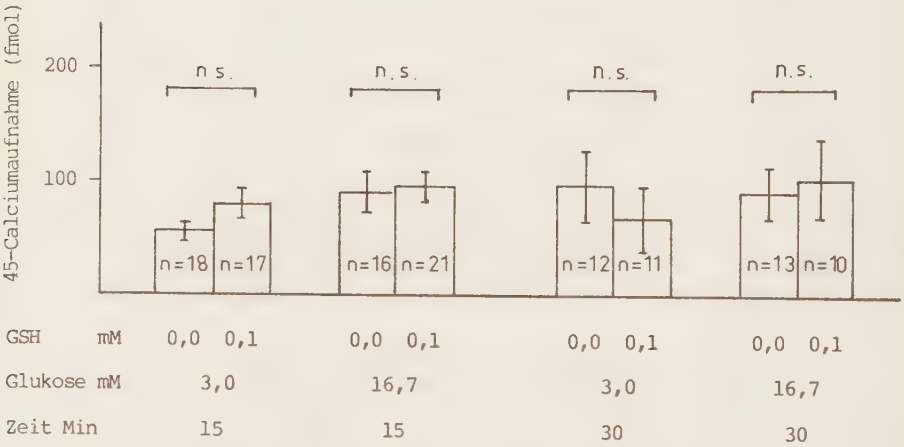
Sowohl bei foetalen als auch bei 5 Tage alten Ratten wurde untersucht, ob die durch substimulatorische oder stimulatorische Glukosekonzentration induzierte 45-Calciumaufnahme durch 0,1 mM GSH verändert werden kann. Bei den Foeten zeigte sich bei beiden Glukosekonzentrationen sowohl nach 15 als auch nach 30 Minuten keine Beeinflussung des Calciuminfluxes durch GSH (Tabelle 12 und Abbildung 12). Auch bei den Neugeborenen konnte durch GSH in keinem Falle die 45-Calciumaufnahme gesteigert werden (Tabelle 13 und Abbildung 13).

Tabelle 12: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von foetalen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Zeit Min	Glukose mM	GSH mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	3,0	0,0	55,6 + 8,1	(18)	
15	3,0	0,1	79,5 + 15,2	(17)	n.s.
15	16,7	0,0	87,4 + 18,9	(16)	
15	16,7	0,1	95,5 + 13,6	(21)	n.s.
30	3,0	0,0	96,7 + 34,2	(12)	
30	3,0	0,1	68,0 + 31,3	(11)	n.s.
30	16,7	0,0	91,0 + 23,0	(13)	
30	16,7	0,1	102,4 + 36,4	(10)	n.s.

20 Inseln von foetalen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 12: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von foetalen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose



GSH	mM	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
Glukose	mM	3,0		16,7		3,0		16,7	
Zeit	Min	15		15		30		30	

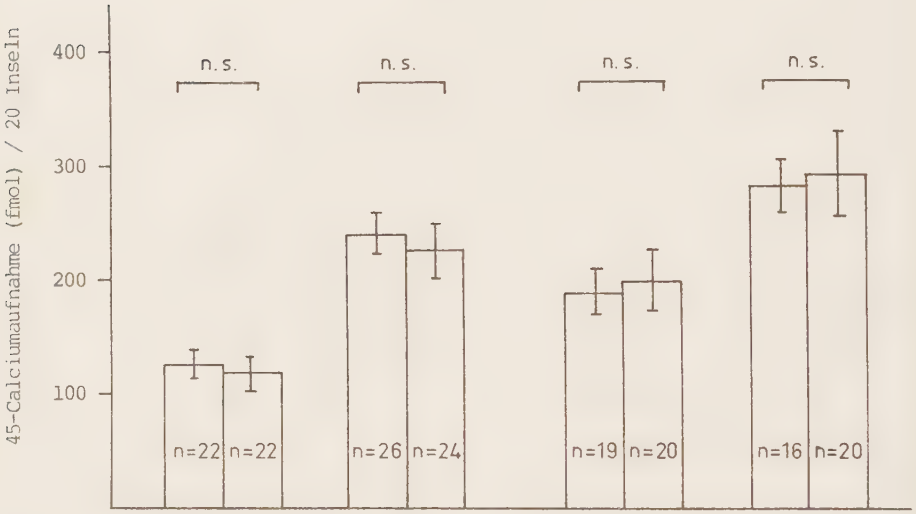
20 Inseln von foetalen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Tabelle 13: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von neugeborenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Zeit Min	Glukose mM	GSH mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	3,0	0,0	127,0 + 15,1	(22)	n.s.
15	3,0	0,1	123,2 + 15,3	(22)	
15	16,7	0,0	239,2 + 19,7	(26)	n.s.
15	16,7	0,1	226,0 +25,4	(24)	
30	3,0	0,0	190,1 + 21,0	(19)	n.s.
30	3,0	0,1	198,5 + 21,0	(20)	
30	16,7	0,0	283,8 + 42,7	(16)	n.s.
30	16,7	0,1	294,6 + 36,0	(20)	

20 Inseln von 5 Tage alten Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 13: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von neugeborener Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose



GSH	mM	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
Glukose	mM	3,0		16,7		3,0		16,7	
Zeit	Min	15		15		30		30	

20 Inseln von 5 Tage alten Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

3.10. Vergleich der 45-Calciumaufnahme bei foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose und von reduziertem Glutathion

Betrachtet man die in Tabelle 14 und Abbildung 14a und 14b dargestellten Ergebnisse, so ist offensichtlich, daß bei 3,0 mM Glukose 0,1 mM GSH nur bei den Inseln von Erwachsenen die 45-Calciumaufnahme steigern kann. Weder bei den Neugeborenen noch bei den Foeten ist eine Beeinflussung des Calciuminfluxes durch GSH sichtbar.

Auch bei stimulatorischer (16,7 mM) Glukose (Tabelle 15 und Abbildung 15a und 15b) zeigt sich, daß die 45-Calciumaufnahme bei Foeten und Neugeborenen nicht durch GSH gesteigert wird, wohl aber in Inseln von Erwachsenen.

3.11. Untersuchung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von 24 Monate alten Ratten im Vergleich zu 3 Monate alten Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

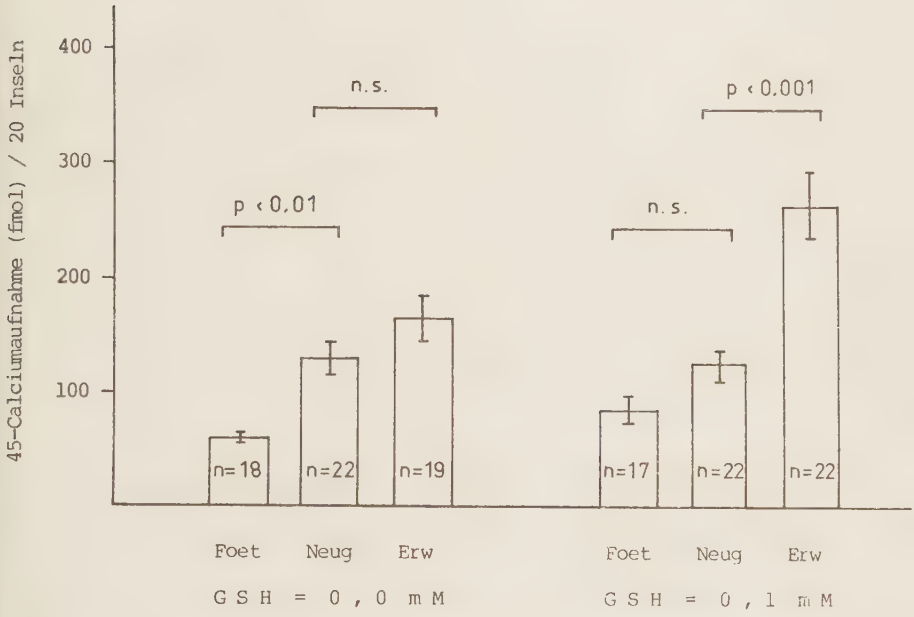
Bei Inkubationszeiten von 15, 30 und 90 Minuten wurde der Calciuminflux in die Inseln von 24 Monate alten Ratten gemessen. Dabei wurde als Stimulans sowohl 3,0 mM als auch 16,7 mM Glukose verwendet. Bei 15 Minuten Inkubationszeit zeigte sich bereits ein deutlicher Unterschied in der 45-Calciumaufnahme zwischen beiden Glukosekonzentrationen von 177,1 + 30,6 fmol auf 329,7 + 49,4 fmol mit einer Signifikanz von $p < 0,05$. Bei 30 Minuten blieb der Unterschied betragsmäßig gleich, war aber wegen der größeren

Tabelle 14: Vergleich der 45-Calciumaufnahme bei foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 mM Glukose und von reduziertem Glutathion

Zeit Min	GSH mM	Alters-stufe	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	0,0	Foet	55,6 + 8,1	(18)	
					< 0,01
15	0,0	Neug	127,0 + 15,1	(22)	
					n.s.
15	0,0	Erw	160,4 + 20,6	(19)	
15	0,1	Foet	79,5 + 15,2	(17)	
					n.s.
15	0,1	Neug	123,2 + 15,3	(22)	
					< 0,001
15	0,1	Erw	259,6 + 31,8	(22)	
30	0,0	Foet	96,7 + 34,2	(12)	
					< 0,05
30	0,0	Neug	190,1 + 21,0	(19)	
					n.s.
30	0,0	Erw	186,7 + 27,9	(15)	
30	0,1	Foet	68,0 + 31,3	(11)	
					< 0,01
30	0,1	Neug	198,5 + 26,3	(20)	
					< 0,02
30	0,1	Erw	291,5 + 31,1	(16)	

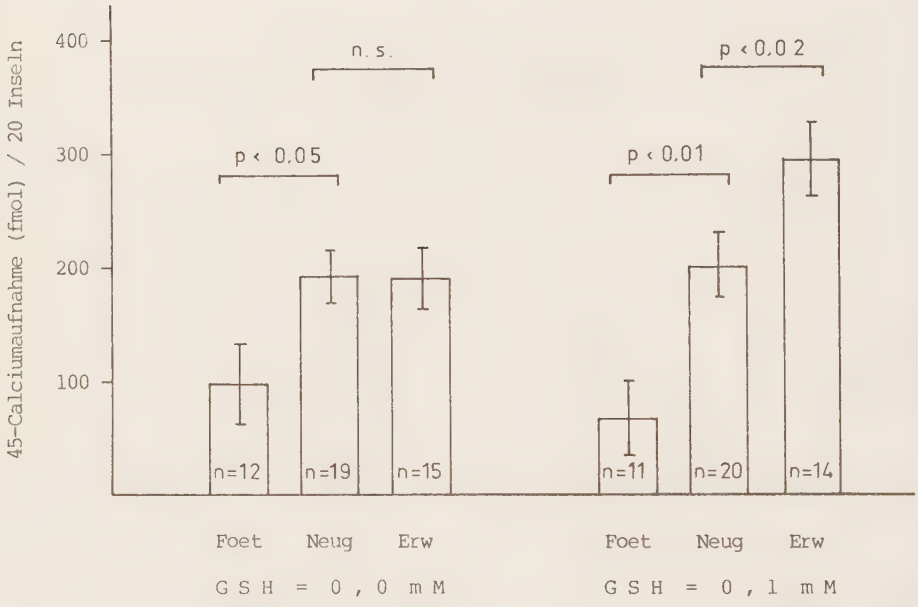
20 Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 14a: Vergleich der 45-Calciumaufnahme bei foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 mM Glukose und von reduziertem Glutathion bei 15 Minuten Inkubationszeit



20 Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 14b: Vergleich der 45-Calciumaufnahme bei foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten in Gegenwart von 3,0 mM Glukose und von reduziertem Glutathion bei 30 Minuten Inkubationszeit



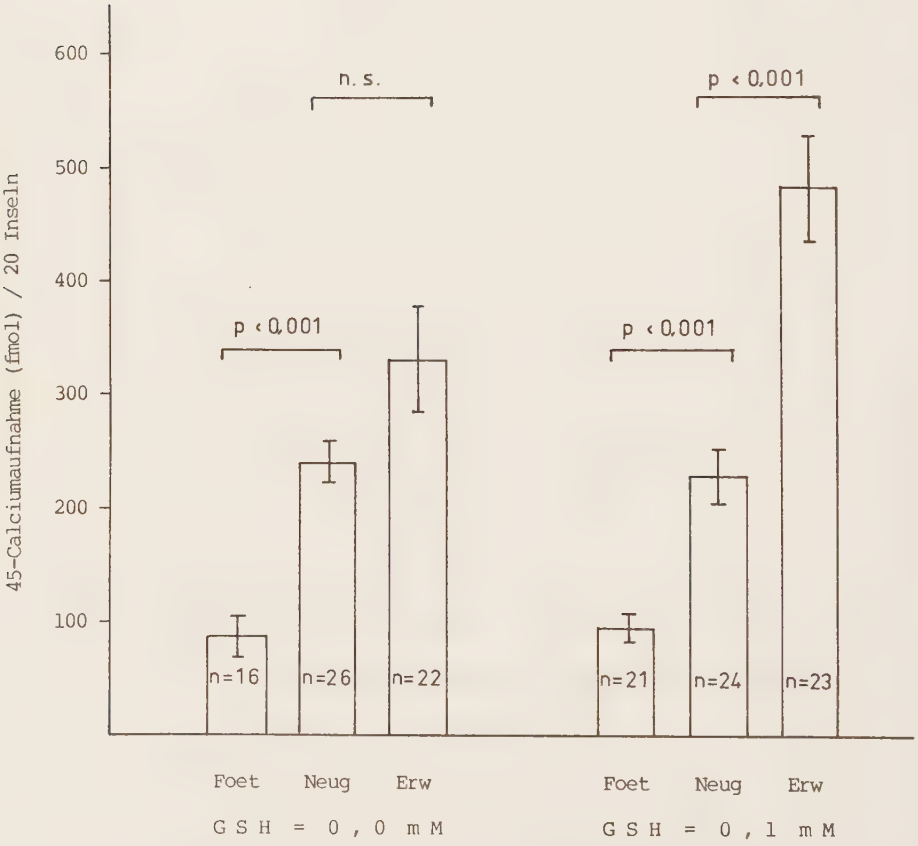
20 Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 30 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Tabelle 15: Vergleich der 45-Calciumaufnahme bei foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glukose und von reduziertem Glutathion

Zeit Min	GSH mM	Alters-stufe	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	0,0	Foet	87,4 + 18,9	(16)	
					< 0,001
15	0,0	Neug	239,2 + 19,7	(26)	
					n.s.
15	0,0	Erw	330,4 + 44,6	(22)	
15	0,1	Foet	95,5 + 13,6	(21)	
					< 0,001
15	0,1	Neug	226,0 + 25,4	(24)	
					< 0,001
15	0,1	Erw	481,9 + 44,4	(23)	
30	0,0	Foet	91,0 + 23,0	(13)	
					< 0,01
30	0,0	Neug	283,8 + 42,7	(16)	
					< 0,05
30	0,0	Erw	453,3 + 57,0	(16)	
30	0,1	Foet	102,4 + 36,4	(10)	
					< 0,01
30	0,1	Neug	294,6 + 36,0	(20)	
					< 0,01
30	0,1	Erw	525,3 + 70,0	(20)	

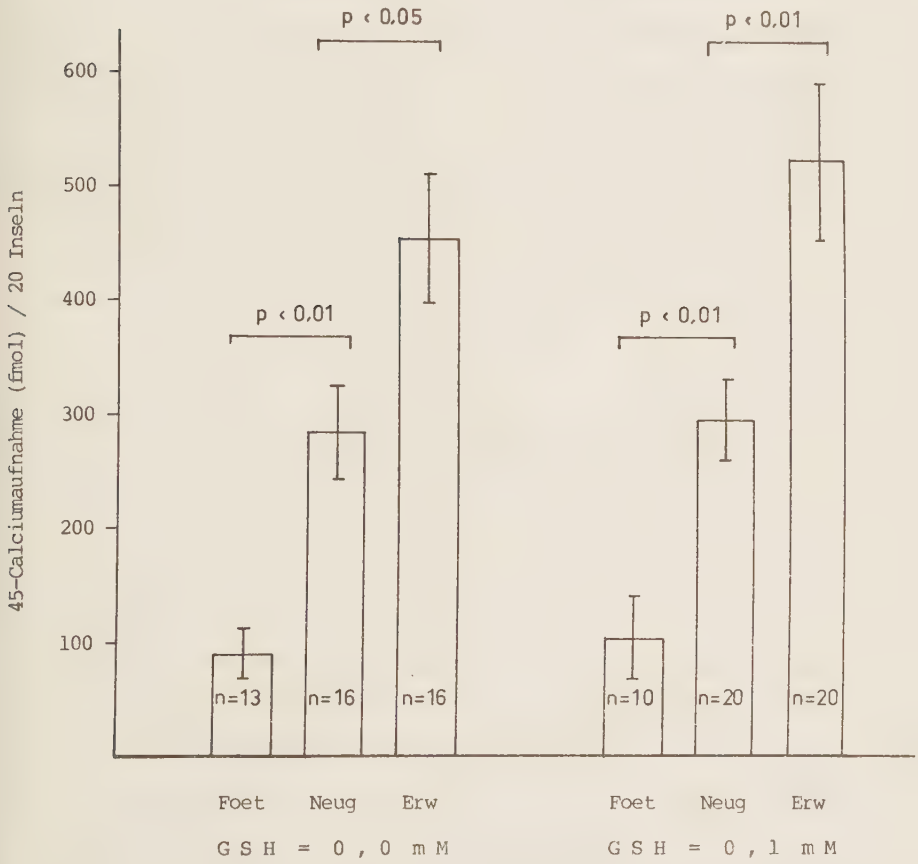
20 Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 15a: Vergleich der 45-Calciumaufnahme bei foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glukose und von reduziertem Glutathion bei 15 Minuten Inkubationszeit



20 Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 Minuten mit 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 15b: Vergleich der 45-Calciumaufnahme bei foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glukose und von reduziertem Glutathion bei 30 Minuten Inkubationszeit



20 Inseln von foetalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 30 Minuten mit 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Streuung nicht mehr signifikant. Mit $p < 0,01$ waren die beiden Werte mit 3,0 oder 16,7 mM Glukose bei 90 Minuten Inkubationszeit deutlich signifikant. Hier war auch die Differenz der beiden Werte fast doppelt so hoch als bei 15 oder 30 Minuten.

Vergleicht man die Werte der alten Ratten mit der 45-Calciumaufnahme in Inseln Erwachsener, so ist bei substimulatorischer Glukosemenge der Calciuminflux bei allen Zeiten gleich. Bei stimulatorischer Glukosekonzentration zeigen die Alten eine etwas geringere 45-Calciumaufnahme als die Erwachsenen bei allen Inkubationszeiten (Tabelle 16 und Abbildung 16). Diese Abnahme ist jedoch nicht statistisch signifikant.

3.12. Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von 24 Monate alten Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Es wurde sowohl bei substimulatorischer als auch bei als auch stimulatrorischer Glukosekonzentration untersucht, ob 0,1 mM GSH in der Lage ist, den Calciuminflux zu verändern. Hier zeigte sich, daß bei 3,0 mM Glukose in 15 Minuten eine Steigerung des Cacliuminfluxes von 177,1 + 30,6 fmol auf 251,9 + 50,9 fmol pro 20 Inseln bei Zusatz von 0,1 mM GSH zu sehen war, der sich aber von dem Wert ohne GSH nicht signifikant unterscheidet. Bei 16,7 mM Glukose war ein Einfluß des zugesetzten GSH auf die Calcimaufnahme nicht zu sehen. Auch bei den Untersuchungen über 30 Minuten konnte keine Wirkung des GSH beobachtet werden.

Vergleicht man den Cacliuminflux der Inseln alter und erwachsener

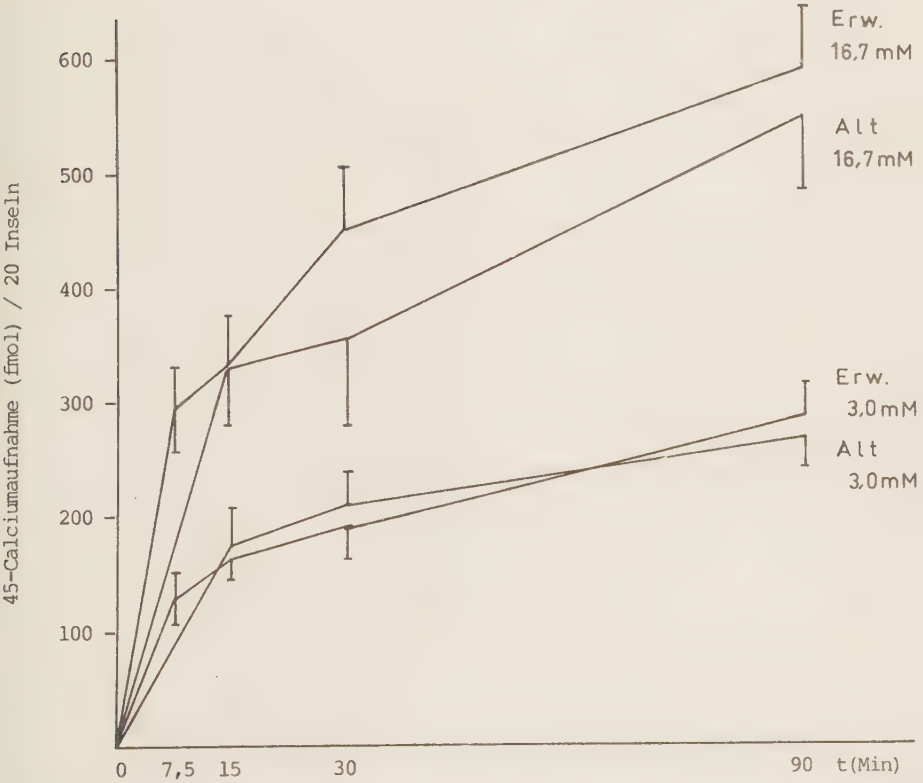
Ratten, so kann man bei 15 Minuten und 3,0 mM Glukose sowohl mit als auch ohne GSH keinen Unterschied sehen. Bei 16.7 mM Glukose und 15 Minuten aber ist bei Zusatz von 0,1 mM GSH die Calciumaufnahme bei Alten signifikant ($p < 0,05$) kleiner als bei Erwachsenen. Bei den Untersuchungen über 30 Minuten mit 0,1 mM GSH war die Calciumaufnahme bei alten Ratten bei beiden Glukosekonzentrationen kleiner als bei erwachsenen (bei 3,0 mM Glukose signifikant mit $p < 0,01$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 und 18 bzw. Abbildung 17 und 18 dargestellt.

Tabelle 16: Untersuchung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von 24 Monate alten Ratten im Vergleich zu 3 Monate alten Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose

Zeit Min	Alterstufe	Glukose mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	Alt	3,0	177,1 + 30,6	(11)	
15	Alt	16,7	329,7 + 49,4	(17)	< 0,05
15	Erw	3,0	160,4 + 20,6	(19)	
15	Erw	16,7	330,4 + 44,6	(22)	< 0,01
30	Alt	3,0	210,7 + 27,1	(19)	
30	Alt	16,7	354,0 + 74,7	(12)	< 0,05
30	Erw	3,0	186,7 + 27,9	(15)	
30	Erw	16,7	453,3 + 57,0	(16)	< 0,001
90	Alt	3,0	270,3 + 28,3	(18)	
90	Alt	16,7	554,1 + 66,2	(25)	< 0,01
90	Erw	3,0	290,1 + 25,4	(29)	
90	Erw	16,7	595,2 + 49,7	(39)	< 0,001

20 Inseln von 2 Jahre alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert.

Abbildung 16: Untersuchung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von 24 Monate alten Ratten im Vergleich zu 3 Monate alten Ratten in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM glukose



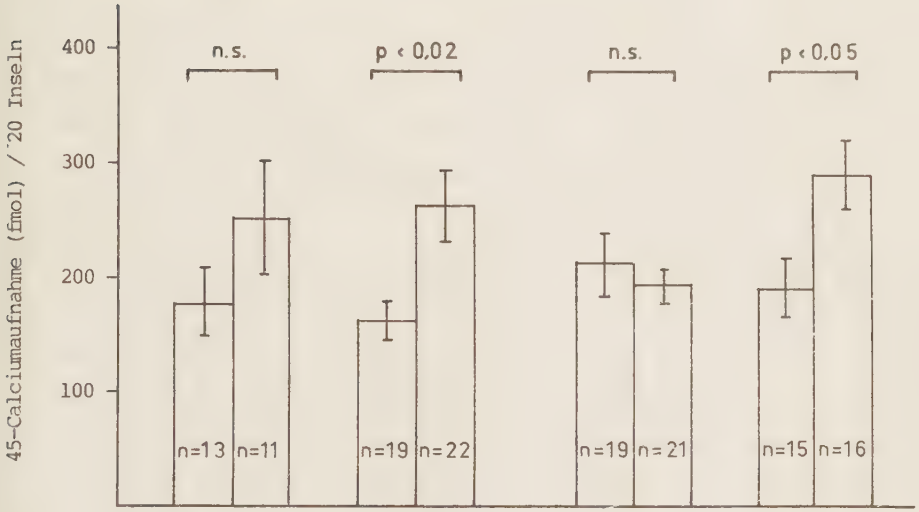
20 Inseln von 2 Jahre alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15, 30 und 90 Minuten mit 3,0 und 16,7 mM Glukose inkubiert.

Tabelle 17: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von 24 Monate alten Ratten in Gegenwart von 3,0 mM Glukose

Zeit Min	Alter-stufe	GSH mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	Alt	0,0	177,1 + 30,6	(13)	n.s.
15	Alt	0,1	251,9 + 50,9	(11)	
15	Erw	0,0	160,4 + 20,6	(19)	< 0,02
15	Erw	0,1	259,6 + 31,8	(22)	
30	Alt	0,0	210,7 + 27,1	(19)	n.s.
30	Alt	0,1	191,8 + 16,9	(21)	
30	Erw	0,0	186,7 + 27,9	(15)	< 0,05
30	Erw	0,1	91,5 + 31,1	(16)	

20 Inseln von 2 Jahre alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 17: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von 24 Monate alten Ratten in Gegenwart von 3,0 mM Glukose



GSH	mM	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
Altersstufe		Alt		Erw		Alt		Erw	
Zeit Min		15		15		30		30	

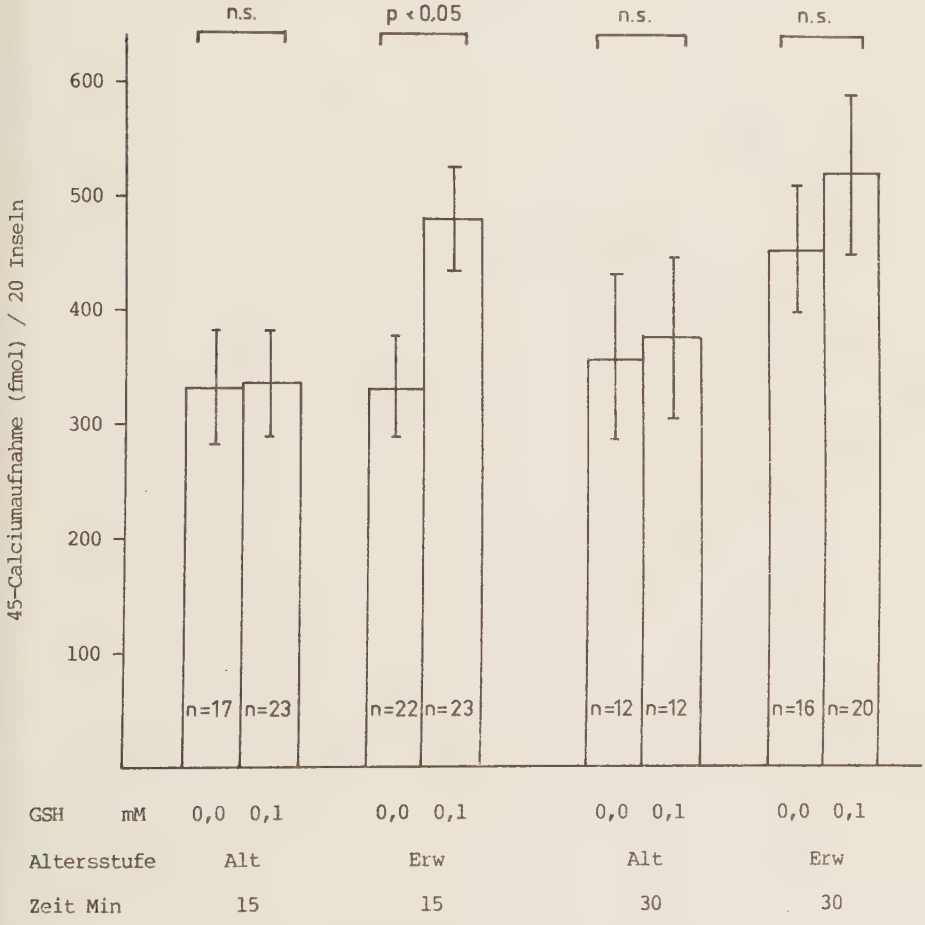
20 Inseln von 2 Jahre alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 3,0 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Tabelle 18: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von 24 Monate alten Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glukose

Zeit Min	Alter-stufe	GSH mM	45-Calciuminflux fmol/20 Inseln	n	p
15	Alt	0,0	329,7 + 49,4	(17)	n.s.
15	Alt	0,1	337,0 + 44,1	(23)	
15	Erw	0,0	330,4 + 44,6	(22)	< 0,05
15	Erw	0,1	481,9 + 44,4	(23)	
30	Alt	0,0	354,0 + 74,7	(12)	n.s.
30	Alt	0,1	379,3 + 72,7	(12)	
30	Erw	0,0	453,3 + 57,0	(16)	n.s.
30	Erw	0,1	525,3 + 70,0	(20)	

20 Inseln von 2 Jahre alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

Abbildung 18: Einfluß von reduziertem Glutathion auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von 24 Monate alten Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glukose



20 Inseln von 2 Jahre alten und erwachsenen Ratten wurden bei 37 Grd. Celsius unter Carbogenbegasung in 1 ml Tris-Puffer-Lösung, die 0,75 % Rinderserumalbumin und 20 uCi/ml 45-Calcium enthielt, 15 und 30 Minuten mit 16,7 mM Glukose inkubiert. Dem Medium waren 0,1 mM GSH zugesetzt.

4. D I S K U S S I O N

4.1. Einfluß von Insulin-Antikörper auf die Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln.

In unserem Arbeitskreis wurde beobachtet, daß exogenes Insulin in einer Konzentration von 200 uE/ml die innerhalb von 30 Minuten durch 16,7 mM Glukose stimulierte Calciumaufnahme hemmt (Ammon et al., 1982 a). Keine Hemmung war zu beobachten, wenn sich im Inkubationsmedium nur eine geringe, die Calciumaufnahme und Insulinsekretion nicht stimulierende Glukosemenge (3,0 mM) befand. Aufgrund dieser Befunde war zu erwarten, daß eine Inkubation von Inseln mit hoher Glukosekonzentration aber in Gegenwart eines Insulin-Antikörpers zu einer weiteren Steigerung der Calciumaufnahme führt, da in einem solchen Fall durch dauerndes Abfangen des sezernierten Insulins eine mögliche Hemmung der Calciumaufnahme vermieden wird. Wie aber Tabelle 1 und Abbildung 1 zeigen, kann man bei Inkubation über 90 Minuten in Gegenwart von 20 mM Glukose und Insulin-Antikörper (in einer Menge, die das in dieser Zeitspanne freigesetzte Insulin bindet) keinerlei Unterschied in der Calciumaufnahme gegenüber den Kontrollversuchen, bei denen ohne Insulin-Antikörper inkubiert wurde, entdecken. Dies ist auf den ersten Blick widersprüchlich, denn es würde nicht zu den oben genannten Befunden passen.
Es hat sich aber gezeigt (Ammon et al., 1982 b), daß unter unseren Versuchsbedingungen (Einsetzen von eisgekühlten Inseln in

das Inkubationsmedium) während der ersten 30 Minuten der Inkubation kaum eine Insulinsekretion stattfindet. Diese steigt erst nach der ersten halben Stunde der Inkubation an. Nur wenn soviel Insulin sezerniert ist, daß es zu einer negativen Rückkopplung kommen könnte (Loubatieres et al., 1968), kann ein zugesetzter Insulin-Antikörper diese Rückkopplung durch Binden des Insulins verhindern (Sodoyez et al., 1970, Verspohl et al., 1979). Während von der 30. bis 90. Minute die eigentliche Insulinsekretion erfolgt und somit erst dann der Insulin-Antikörper wirksam werden kann, ist in dieser Zeit nur noch eine geringe Steigerung der Calciumaufnahme zu sehen, da in den ersten 30 Minuten in unseren Versuchen bereits 75 % des Calciuminfluxes stattfand (Tabelle 4, Abbildung 4). Dabei fällt auf, daß der Calciuminflux von der 30. bis zur 90. Minute sowohl bei 3,0 mM als auch bei 16,7 mM Glukose mengenmäßig in etwa gleicher Weise ansteigt. Quantitativ zeigt sich demnach der Hauptunterschied in der Calciumaufnahme bei Gegenwart von 3,0 oder 16,7 mM Glukose in den ersten 30 Minuten. Aus diesen Gründen ist es sehr plausibel, daß sich der Zusatz von Antikörper hier nicht in einer nennenswerten Steigerung der Calciumaufnahme auswirkt, da zu dieser Zeit eine mögliche feedback Wirkung von sezerniertem Insulin noch nicht zu erwarten ist.

4.2. Einfluß des Ionophors A 23187 auf den Calciuminflux und die Insulinsekretion.

Kürzlich wurde von Ammon und Abdel Hamid (1982 b) vorgeschlagen, daß es unter den Stimulatoren der Insulinsekretion solche gibt, deren Wirkung von einem gewissen Redoxzustand des intrazellulären GSH abhängig ist und solche, die keine Abhängigkeit zeigen. Dabei wurde von den Autoren die Vermutung ausgesprochen, daß insbesondere solche Stimulatoren thiolabhängig sind, die zu einer Aufnahme von Calcium über den voltabhängigen Calciumkanal führen. Dagegen sollen Stimulatoren, die zu einer Zunahme des cAMP führen, in ihrer insulinsekretorischen Wirkung nicht thiolabhängig sein.

Beim Ionophor A 23187 handelt es sich um eine Substanz, die durch Komplexbildung (Pfeiffer et al., 1978) Calcium an sich bindet und ohne Benutzung des voltabhängigen Calciumkanals Calcium in die Zelle hineintransportiert. Es wird angenommen, daß der Anstieg des intrazellulären Calciums, der auf diese Weise erzielt wird, einen wichtigen Anstoß für die weiteren Vorgänge gibt, die zur Sekretion von Insulin führen. Conaway et al., (1976) konnten zeigen, daß der Ionophor A 23187 in einer Konzentration von 10 uM bei Inseln von Hunden eine deutliche Insulinsekretion ergibt, ohne daß Glukose im Medium anwesend war. Hellman (1975) glaubt, daß diese Insulinsekretion allerdings nicht durch Exocitose sondern durch eine veringerte intrazelluläre Stabilität der Sekretionsgranula stattfindet. Er führte aber diese Untersuchungen mit dem nicht so Calcium spezifischen Ionophor X-537-A durch.

Wie Tabelle 3 und Abbildung 3 zeigen, kommt es bei der von uns verwendeten Konzentration von Ionophor (66,6 uM) in Anwesenheit substimulatorischer Glukose (3,0 mM) zu einer signifikanten Zunahme der 45-Calciumaufnahme in der Langerhansschen Insel. Interessanterweise führt jedoch die zusätzliche Anwesenheit des Thioloxidants DIP, von dem bereits gezeigt wurde, daß es die sekretorische Wirkung von Glukose hemmt (Eujen, 1979), nicht zu einer Hemmung der durch den Ionophor hervorgerufenen Calciumaufnahme. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die Calciumaufnahme, die durch den Ionophor bewirkt wird, nichts mit dem Redoxzustand der Thiole zu tun hat, im Gegensatz zur Calciumaufnahme, die durch Glukose induziert wird. Es läßt sich also hinsichtlich der Thiolabhängigkeit der Calciumaufnahme ein Unterschied zwischen Glukose und dem Ionophor A 23187 ableiten.

Ammon et al. (1982 c) fanden, daß bei Anwesenheit substimulatorischer Glukosekonzentration die durch den Ionophor A 23187 hervorgerufene Insulinsekretion durch DIP nicht gehemmt werden kann. Daraus ergibt sich als zweite wichtige Schlußfolgerung, daß, sofern der Calciuminflux einmal stattgefunden hat, alle weiteren Schritte, die schließlich zur Exocitose führen, thiolunabhängig sind. Dabei ist es unwichtig, ob der Calciuminflux über die Calciumkanäle oder durch den Ionophor geschah.

4.3. Calciumaufnahme bei Inseln foetaler Ratten.

Wie in der Einleitung beschrieben, führt die Erhöhung der Glukosekonzentration bei Inseln foetaler Ratten im Gegensatz zu Inseln erwachsener Ratten nicht zu einem Anstieg des reduzierten Glutathions (Lutz, 1981). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß bei Foeten auf Glukose keine Sekretion von Insulin zustande kommt. Wie bereits erwähnt, ist die insulinsekretorische Wirkung der Glukose einerseits thiolabhängig, anderseits ist auch die Calciumaufnahme eine notwendige Bedingung für die Exocitose. Daher wäre es denkbar, daß beim Foeten das Unvermögen, den GSH/GSSG-Quotienten bei Erhöhung der Glukosekonzentration zu ändern, möglicherweise Wirkungen auf die Calciumaufnahme hat. So war es von Interesse, ob sich beim Foeten eine Störung der Calciumaufnahme nachweisen läßt.

Wie Tabelle 5 und Abbildung 5 zeigen, findet sich in der Tat bei Zusatz von 16,7 mM Glukose zu foetalen Inseln im Gegensatz zu unseren Befunden mit Inseln erwachsener Ratten keine signifikante Steigerung der Calciumaufnahme gegenüber des Calciuminfluxes in Gegenwart von 3 mM Glukose. Die fehlende Insulinantwort bei foetalen Inseln nach Erhöhung der Glukosekonzentration auf 16,7 mM dürfte also auf ein nicht Funktionieren der durch Glukose induzierten Calciumaufnahme beruhen. Es ist denkbar, daß diese Blockade letztlich die Folge eines nicht voll entwickelten Redoxsystems der Thiole ist.

4.4. Einfluß von exogenem GSH auf die Calciumaufnahme.

Ammon et al. (1979) hatten bereits beobachtet, daß eine Verminderung des GSH/GSSG-Quotienten durch Methylenblau, t-BHP oder Diamid zu einer verringerten Insulinsekretion führt. Ammon et al. (1982 c) zeigten, daß DIP die durch Glukose (20 mM) stimulierte Insulinsekretion mindert, und diese Minderung mit einer Verringerung des GSH/GSSG-Quotienten und des Calciuminflux einhergeht. Die Autoren schlossen daraus, daß es eine Korrelation sowohl zwischen dem GSH/GSSG-Quotienten und dem Calciuminflux als auch zwischen dem Calciuminflux und der Insulinsekretion geben könnte. Weiterhin wurde beobachtet, daß der Zusatz von reduziertem Glutathion sowohl beim perfundierten Pankreas (Ammon et al., 1981) als auch an der isolierten Insel (Ammon et al., 1982 b) die durch Glukose (11,1 mM) induzierte Insulinsekretion steigert, was als weiterer Beweis für die Thiolabhängigkeit der glukoseinduzierten Insulinsekretion angesehen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nun (Tabelle 11, Abbildung 11), daß die Zugabe von exogenem GSH sowohl bei substimulatorischer als auch bei stimulatorischer Glukosekonzentration eine Steigerung der Calciumaufnahme bewirkt. Allerdings war dieses Ergebnis nach 15 Minuten Inkubationszeit bei beiden, bei 30 Minuten Inkubationszeit nur bei substimulatorischer Glukosekonzentration zu beobachten. Da GSH relativ rasch in sauerstoff haltigem Medium zu GSSG oxidiert wird (Tabelle 10, Abbildung 10), ist die kurze Wirkungsdauer von GSH auf die Calciumaufnahme verständlich. Ein Einfluß von GSSG auf die Calciumaufnahme (Tabelle 9, Abildung 9) wurde durch separate

Versuche ausgeschlossen.

Somit ist wohl eine Beziehung zwischen der Verfügbarkeit von GSH und dem Calciuminflux sehr wahrscheinlich, da die Verminderung von GSH zu einer Hemmung der durch Glukose induzierten Calciumaufnahme, Zusatz von exogenem GSH dagegen zu einer Steigerung führt.

Auf die Frage, über welchen Weg exogenes GSH die Calciumaufnahme in Langerhansche Inseln steigert, kann man zwei Antworten vermuten. Einerseits wäre es möglich, da diese Steigerung bei beiden Glukosekonzentrationen zu sehen ist, daß exogenes GSH die Calciumaufnahme, die nicht über den voltabhängigen Kanal stattfindet und daher nicht durch Glukose stimuliert wird, beeinflußt. Anderseits könnte man annehmen, daß durch exogenes GSH die Schwellendosis des voltabhängigen Calciumkanals gegenüber der stimulierenden Wirkung von Glukose herabgesetzt wird.

4.5. Calciumaufnahme bei Inseln foetaler Ratten unter Einfluß von exogenem GSH.

Als Lutz (1981) gezeigt hatte, daß sich bei Inseln von foetalen Ratten durch Glukose der Gehalt an reduziertem Glutathion kaum steigern ließ, lag der Schluß nahe, daß dies einer der Gründe sein könnte, warum Glukose im foetalen Alter die Insulinsekretion nicht stimuliert. Dies ist auch deshalb wahrscheinlich, da eine Korrelation zwischen dem GSH/GSSG-Quotienten und der Insulinsekretion bekannt ist (Ammon et al., 1979) und in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, daß bei Foeten die

Calciumaufnahme durch Glukose nicht gesteigert werden kann. Es wäre daher naheliegend anzunehmen, daß exogen zugeführtes GSH bei Inseln von Foeten die Calciumaufnahme steigern kann. Daß aber die Zufuhr von exogenem GSH bei foetalen Inseln keine Erhöhung des Calciuminfluxes ergibt (Tabelle 12, Abbildung 12), läßt nun die Annahme zu, daß die foetale Insel das angebotene GSH nicht für den Prozeß der Calciumaufnahme verwerten kann. Da der foetalen Insel auch die Fähigkeit bei Erhöhen der Glukosekonzentration reduziertes Glutathion zu bilden fehlt, scheinen also mindestens zwei Defekte für die Unfähigkeit Calcium aufzunehmen und Insulin zu sezernieren verantwortlich zu sein.

4.6. Calciumaufnahme bei Inseln neugeborener Ratten und Beeinflussung durch zugesetztes GSH.

Wie bereits in der Einleitung erörtert (1.5.), funktioniert die Insulinsekretion bei neugeboren Ratten in der gleichen Art wie bei Erwachsenen, allerdings ist die Sekretionsleistung wesentlich geringer. So paßt es auch gut in die Modellvorstellung der Stimulations-Sekretions-Kette, daß die Inseln von neugeborenen Ratten in ähnlicher Weise wie Inseln von Erwachsenen Calcium aufnehmen (Tabelle 7, 8 und Abbildung 7, 8). Zwar ist der Calciuminflux absolut gesehen kleiner als bei Erwachsenen, doch ist der Verlauf der Calciuminflux-Kurve über 90 Minuten bei Erwachsenen und Neugeborenen sehr ähnlich (Tabelle 6, Abbildung 6).

Die Zugabe von exogenem GSH bringt aber nicht die theoretisch zu

erwartende Steigerung in der Calciumaufnahme (Tabelle 13, Abbildung 13). Es scheint also bei Neugeborenen wie bei Foeten so zu sein, daß sie auf exogen zugeführtes GSH nicht mit einer weiteren Calciumaufnahme reagieren können. Das könnte damit zusammenhängen, daß bei Neugeborenen zwar die durch Glukose induzierte Steigerung des GSH/GSSG-Quotienten und die Verwertbarkeit von intrazellulärem GSH für die Calciumaufnahme funktioniert, nicht jedoch die Verwertbarkeit von exogenem GSH.

4.7. Calciumaufnahme bei Inseln alter Ratten und dessen Beeinflussung durch zugeührtes GSH.

Schon in der Einleitung (1.6.) ist dargelegt worden, wie uneinheitlich die Auffassung über die Insulinsekretion bei alten Ratten ist. Es konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit kein Ergebnis gefunden werden, das einen klaren Hinweis über die Ursache der schlechteren Glukosetoleranz im Alter geben könnte. Bei stimulatorischer Glukosekonzentration zeigte sich zwar im Vergleich zu Erwachsenen eine geringere Calciumaufnahme, aber dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (Tabelle 16, Abbildung 16).

Bei der Zugabe von exogenem GSH zum Inkubationsmedium zeigte sich, daß bei substimulatorischer Glukose in 15 Minuten der Calciuminflux bei den alten Ratten weniger gesteigert werden konnte als bei Erwachsenen. Bei stimulatorischer Glukosekonzentration konnte aber keinerlei Erhöhung der Calcimaufnahme durch GSH gesehen werden. Es haben also alte Ratten im Vergleich

zu Erwachsenen eine geringere Verwertbarkeit von exogenem GSH für den Prozeß der Calciumaufnahme. Auch kann der GSH-Gehalt bei alten Ratten durch stimulatorische Glukosekonzentration nicht erhöht noch der GSH/GSSG-Quotient geändert werden, wie Eujen (1979) fand. Es scheint also bei den Inseln von alten Ratten ähnlich wie bei Foeten sowohl eine verminderte Bereitstellung von GSH als auch eine geringere Steigerungsmöglichkeit der 45-Calciumaufnahme vorzuliegen.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

5.1. Zielsetzung

1. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die durch den Ionophor A 23187 hervorgerufene 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln der Ratte durch das Thioloxidants DIP gehemmt werden kann.

2. Weiterhin sollte die 45-Calciumaufnahme bei Inseln von foetalen und neugeborenen Ratten im Vergleich zu erwachsenen in Gegenwart von 3,0 und 16,7 mM Glukose zeitabhängig untersucht werden.

3. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob exogen zugesetztes GSH bei Inseln von erwachsenen, neugeborenen und foetalen Ratten die 45-Calciumaufnahme steigern kann.

4. Zuletzt sollte noch die 45-Calciumaufnahme in Inseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu erwachsenen untersucht werden sowie der Einfluß von exogenem GSH auf deren 45-Calciumaufnahme.

5.2. Ergebnisse

1. Die in Gegenwart von 3,0 mM Glukose durch den Ionophor A 23187 hervorgerufene Steigerung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln von erwachsenen Ratten konnte durch das Thioloxidants DIP nicht gemindert werden.

2. Die Inseln von foetalen Ratten zeigten bei 3,0 mM Glukose eine basale 45-Calciumaufnahme, die weder durch eine Erhöhung der Glukosekonzentration von 3,0 auf 16,7 mM noch durch Verlängerung der Inkubationszeit von 30 auf 90 Minuten gesteigert werden konnte.
   Bei den Neugeborenen ließ sich durch stimulatorische Glukosekonzentration die 45-Calciumaufnahme signifikant steigern. Die Kurve der 45-Calciumaufnahme über 90 Minuten zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bei Erwachsenen, lag allerdings deutlich niedriger.

3. Exogen zugeführtes GSH konnte nur bei Inseln von erwachsenen Ratten die 45-Calciumaufnahme sowohl bei 3,0 als auch bei 16,7 mM Glukose signifikant erhöhen, nicht aber bei Foeten oder Neugeborenen.

4. Die Inseln von 2 Jahre alten Ratten zeigen eine ähnliche und nur wenig niedrigere 45-Calciumaufnahme wie die Inseln erwachsener Tiere, aber bei den Inseln alter Ratten konnte keine Steigerung des 45-Calciuminfluxes durch exogenes GSH festgestellt werden.

5.3. Schlußfolgerungen

1. Die 45-Calciumaufnahme durch den Ionophor A 23187 ist anscheinend von dem Redoxzustand in der Inselzelle unabhängig. Ist der Calciuminflux einmal erfolgt, so laufen alle weiteren Schritte, die zur Insulinsekretion führen, thiolunabhängig ab.

2. Es ist möglich, daß die fehlende sekretorische Antwort von foetalen Inseln auf eine Glukosestimulation die Folge der nicht stimulierbaren Calciumaufnahme ist. Bei Inseln von foetalen Ratten ist es weiterhin denkbar, daß die gehemmte 45-Calciumaufnahme im Zusammenhang mit einem nicht voll entwickelten Redoxsystems der Thiole steht.

3. a.) Zwischen der Verfügbarkeit von GSH und dem Calciuminflux bei erwachsenen Ratten besteht eine Beziehung.

   b.) Da bei der Insel von erwachsenen Ratten der Zusatz von GSH die Calciumaufnahme sowohl bei 3,0 als auch bei 16,7 mM Glukose steigert, ist es einerseits denkbar, daß exogenes GSH bereits an der Calciumaufnahme eingreift, die nicht durch den voltabhängigen Kanal erfolgt und daher durch Glukose nicht beeinflußt wird, andererseits die Schwellendosis (threshold) des voltabhängigen Calciumkanals gegenüber der stimulierenden Wirkung der Glukose herabsetzt.

   c.) Der foetalen Insel fehlt die Fähigkeit vermehrt reduziertes Glutathion zu bilden und auf exogenes GSH mit einer Steigeung der Calciumaufnahme zu reagieren.

d). Inseln von Neugeborenen können zwar den Gehalt an intrazellulärem GSH bei Erhöhen der Glukosekonzentration steigern, aber eine Verwertbarkeit von exogenem GSH zu einer erhöhten 45-Calciumaufnahme ist noch nicht möglich.

4. Bei Inseln von 2 Jahre alten Ratten, die eine gegenüber Inseln von erwachsenen Ratten nur wenig verringerte 45-Calciumaufnahme zeigen, scheint ähnlich wie bei den Inseln von Foeten die Bereitstellung von intrazellulärem GSH sowie die Verwertbarkeit von exogenem GSH bezüglich der Calciumaufnahme vermindert zu sein.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Agren, A., Brolin, S.E., Hellerström, C. (1975)
Glucose phosphorylation and insulin release of the pancreatic islets from newborn rats.
Diabetologia 11, 329

Agren, A., Andersson, A., Hellerström, C. (1976)
Effects of D-glyceraldehyde and D-glucose on the insulin release of pancreatic islets isolated from the newborn rat.
Febs Lett. 71, 185-188

Amm, U. (1981)
Einfluß von Alter, Leucin und α-Ketoisocapronat auf Glukose-oxidation und Pentosephosphatshunt-Aktivität Langerhansscher Inseln.
Dissertation Tübingen

Ammon, H.P.T. (1973)
Stimulierung der Insulinsekretion durch Tolbutamid. Untersuchungen beim experimentellen Diabetes.
Arzneim.-Forschung (Drug Res) 23, 1675-76

Ammon, H.P.T. (1974)
Der Einfluß des Alters auf Glukoseoxidation und Pyridin-nukleotide der Langerhansschen Insel.
Akt. Geront. 4, 755-757

Ammon, H.P.T., Akhtar, M., Niklas, H., Hegner, D. (1977)
Inhibition of p-chlomercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide, and tert.-buthyl hydroperoxide.
Mol. Pharmacol. 13, 598-605

Ammon, H.P.T., Akhtar, M., Grimm, A., Niklas, H. (1979)
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG rations and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 91-9

Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, J. (1980)
Islets glutathion and insulin release.
Diabetes 29, 830-834

Ammon, H.P.T., El Amri, N., Youssiff, N., Hägele, R., (1982 a)
Inhibitory action of exogenous insulin on the uptake of calcium into rat pancreas islets.
Endocrin. in press

Ammon, H.P.T., Abdel Hamid, M., Rao, P.G., Enz, G. (1982 b)
Thiol dependent and non thiol dependent stimulators of insulin release.
Diabetes, in press

Ammon H.P.T., Hägele, R., Youssiff, N., Eujen, R., El Amri, N. (1982 c)
A possible role of intracellular membran thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake on insulin release.
Endocrin. in press

Andersson, A., Grill, V., Asplund, K., Berne, C., Agren, A., Hellerström, C. (1975)
Functional maturation of the pancreatic ß-cell.
In: Early diabetes in early life (eds.: Camerini-Davalos, R., Cole, H.S.)
Academic Press, New York, pp. 49-56

Asplund, K., Westmann, S., Hellerström, C. (1969)
Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of fetal and newborn rats.
Diabetologia 5, 260-262

Asplund, K, (1973 a)
Dynamics of insulin release from the foetal and neonatal rat pancreas.
Europ. J. Clin. Invest. 3, 338-344

Asplund, K. (1973 b)
Efects of glucose on insulin biosynthesis in fetal and newborn rats.
Horm. Metab. Res. 5, 410

Asplund, K., Andersson, A., Jarousse, C., Hellerström, C. (1975)
Symposium II: Fetomaternal unit in diabetes. Clinical and experimental aspects: Function of the fetal endocrine pancreas.
Israel J. Med. Sci. 11, 581-590

Barbagallo-Sangiorgi, G., Laudicina, E., Bompiani, G.D., Durante, F. (1970)
The pancreatic beta-cell response to intravenous administration of glucose in elderly subjects.

Boschero, A.C., Kawazu, S., Duncan, G., Malaisse, W.J. (1977)
Effect of glucose on K+ handling by pancreatic islets.
Febs. Lett. 83, 151-54

Bracho-Romero, e., Reaven, G.M. (1977)
Effect of age and weight on plasma glucose and insulin responses in the rat.
J. Am. Geriatr. Soc. 19, 122-130

Breemen, C.van, Farinas, B.R., Gerba, P., McNaughton, E.D. (1972)
Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by lanthanum method for measuring cellular calcium influx.
Circulation Res. 30, 44-54

Brisson, G.R., Malaisse-Lague, F., Malaisse, W.J. (1972)
The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. VII. A propodes site of action for adenosine-3'-5'-cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest. 51, 232-41

Bumiller, G. (1981)
Insulinsekretion und Redoxzustand der Pyridinnukleotide Langerhansscher Inseln von foetalen, neugeborenen, erwachsenen und alten Ratten.
Dissertation Tübingen

Burr, J.M., Kanawaza, Y., Marliss, E.B., Lambert, A.E. (1971)
Biphasic insulin release from perifused cultured fetal rat pancreas. Effects of glucose, pyruvate and theophylline.
Diabetes 20, 592-597

Charles, M.A., Lawecki, J., Steiner, A.L., Grodsky, G.M. (1976)
Cyclic nucleotides in pancreatic islets. Tolbutamide- and argenine-induced insulin release.
Diabetes 25, 256-59

Clark, J.L., Steiner, D.F. (1969)
Insulin biosynthesis in the rat: Demonstration of two proinsulins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 278

Clark, W.R., Rutter, W.J. (1972)
Synthesis and accumulation of insulin in the fetal rat pancreas.
Dev. Biol. 29, 468-481

Coddling, J.A., Kalnis, A., Haist, R.E. (1975)
Effects of age and fasting on the reponsiveness of the insulin-secreting mechanism of the islets of Langerhans to glucose.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 53, 716-725

Conaway, H.H., Griffey, M.A., Marks, S.R., Whitney, J.E. (1976)
Ionophore A 23187-induced insulin secretion in isolated, perfused dog pancreas.
Horm. Metab. Res 8 351-353

Couturier, E., Malaisse, W.J. (1980)
Synergistic effects of hypoglycaemic sulphonylureas and antibiotic ionophores upon calcium-translocation.
Br. J. Pharmacol. 71, 315-20

Crockford, P.M., Harbeck, R.J., Williams, R.H. (1966)
Influence of age on intravenous glucose tolerance and serum immunoreactive insulin.
Lancet I, 465-467

Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M. (1968)
Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Am. J. Physiol. 214, 174-78

Defronzo, R.A. (1979)
Glucose intolerance and aging. Evidence for tissue insensitivity to insulin.
Diabetes 28, 1095-1100

Devis, G., Somers, G., Malaisse, W.J. (1975)
Stimulation of insulin release by calcium.
Biochem. Biophys. Res. Com. 67, 525-28

Devis, G., Somers, G., Malaisse, W.J. (1977)
Dynamics of calcium-induced insulin release.
Diabetologia 13, 531-36

Duckworth, W.C., Kitabchi, A.E. (1976)
The effect of age on plasma proinsulin-like material after oral glucose.
J. Lab. Clin. Med. 88, 359-367

Dudl, J., Ensinck, J. (1977)
Insulin and glucagon relationships during aging in man.
Metabolism 26, 33-41

Düppenbecker, H. (1981)
Einfluß der Glukosekonzentration auf die Glukoseutilisation, die Glukoseoxidation sowie die Pentosephosphatshunt-Aktivität bei Langerhansschen Inseln von fötalen, neugeborenen und trächtigen Ratten.
Dissertation, Tübingen

Espinosa de los Monteros, A., Dirscoll, S.G., Steinke, J. (1970)
Insulin release from isolated human fetal pancreatic islets.
Science 168, 1111-1112

Eujen, R. (1979)
Zur Rolle des reduzierten Glutathions Langerhansscher Inseln der Ratte bei der Sekretion von Insulin.
Dissertation Tübingen

Fedele, D., Valerio, A., Molinari, M., Crepaldi, G. (1977)
Glucosetolerance, insulin, and glucagon secretion in aging.
Diabetologia 13, 392

Flatt, P.R., Boquist, L., Hellman, B. (1980 a)
Calcium and pancreatic ß-cell function. The mechanism of insulin secretion studied with the aid of lanthanum.
Biochem. J. 190, 361-72

Flatt, P.R., Bergren, P.-O., Gylfe, E., Hellman, B. (1980 b)
Calcium and pancreatic ß-cell function. IX. Demonstration of lanthanide-induced inhibition of insulin secretion independent of modifications in transmembrane Ca-2+ fluxes.
Endocrin. 107, 1007-13

Formby, B., Capito, K., Egeberg, J., Hedeskov, C.J. (1976)
Calcium-activated ATPase activity in subcellular fractions of mouse pancreatic islets.
Am. J. Physiol. 230, 441

Freie, H.M.P., Pasma, A., Bonman, P.R. (1975)
Quantitative analylis of pancreatic islet development and insulin storage in the fetal and newborn rat.
Acta Endocrin. 80, 657-666

Gaeke, R.F., Kaplan, E.L., Rubenstein, A., Starr, J., Burke, B. (1975)
Insulin and proinsulin release during calcium infusion in a patient with islet cell tumor.
Metabolism 24, 1029-34

Gold, G., Karoly, K., Freeman, C., Adelman, R.C. (1976)
A possible role for insulin in the altered capability for hepatic enzyme adaption during aging.
Biochen. Biophys. Res. Commun. 73, 1003-1010

Gold, G., Reaven, G.M., Reaven E.Ep. (1981)
Effect of age on proinsulin and insulin secretory patterns in isolated islets of rat.
Diabetes 30, 77-82

Grasetti, D.R. (1969)
Some biochemical effects of thiole-forming disulfids and their use in study by cell thiols.
Ann. Ist. Sup. Sanita 5, 645

Grill, V., Cerasi, E. (1975 a)
Glucose induced cAMP accumulation in rats islets of Langerhans: Preferential effect of the α-anomer.
Febs. Lett. 54, 80-83

Grill, V., Asplund, K., Hellerström, C., Cerasi, E. (1975 b)
Decreased c-AMP and insulin response to glucose in isolated islets of neonatal rats.
Diabetes 24, 746-752

Grimm, A. (1978)
Glutathion und insulinsekretion.
Mikromethoden zur Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Langerhansschen Inseln. Beziehung zwischen dem GSH/GSSG-Quotienten und glukoseinduzierter Insulinsekretion.
Dissertation Tübingen

Grodsky, G.M., Bennett, L.L. (1966)
Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.
Diabetes 15, 910-13

Gylfe, E., Hellman, B. (1978 a)
Calcium and pancreatic cell function. II. Mobilisation of glucose sensitive 45-calcium from perfused islets rich in B-cells.
Biochim. Biophys. Acta 538, 249-57

Gylfe, E., Buitrago, Berggren, P.-O., Hammarström, Hellman, B. (1978 b)
Glucose inhibition of 45-calcium efflux from pancreatic islets.
Am. J. Physiol. 235, 191

Hägele, R. (1981)
Einfluß extrazellulär und intrazellulär wirkender Thiol-oxidantien auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte.
Dissertation Tübingen

Hagemann, E. (1960)
Ratte und Maus, Versuchstiere in der Forschung.
W. de Gruyter Verlag Berlin

Hajdu, A., Herr, F., Rona, G. (1968)
The functional significance of a spontaneous pancreatic islet change in aged rats.
Diabetologia 4, 44-47

Hanks, J.H., Wallace, E.R. (1949)
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

Heinze, E., Steinke, J. (1971)
Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: Difference between fetal and adult rats.
Endocrinology 88, 1259-1263

Heinze, E., Steinke, J. (1972)
Insulin secretion during development: Response of isolated pancreatic islets of fetal, newborn and adult rats of theophyllin and arginine.
Horm. Metab. Res. 4, 234-236

Heinze, E, Schatz, H, Nierle, C, Pfeiffer, E.F. (1975 a)
Insulin Biosynthesis in isolated Pancreatic Islets of Fetal and Newborn Rats.
Diabetes 24, 373-377

Heinze, E., Beischer, W., Osorio, J., Pfeiffer, E.F. (1975 b)
Insulin secretion in perinatal period of the rat:
In vivo and in vitro effects of glucose and glibenclamide (HB 419).
Diabetologia 11, 313-320

Hellerström, C., Andersson, A., Gunarsson, R., Berne, C., Asplund, C. (1974)
Cytophysiology and metabolism of pancreatic B-cell.
Endocrinologica Experimentalis 8, 115-126

Hellerström, C.A., Agren, A., Andersson, A. (1976)
Effects of D-glyceraldehyde and D-glucose on the insulin release of pancreatic islets isolated from the newborn rat.
Febs Letters 71, 185-188

Hellman, B. (1959)
The volumetric distribution of the pancreatic islet tissue in young and old rats.
Acta endocrin. 31, 91-106

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lermark, A., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1974)
Membran sulfhydryl groups and pancreatic beta cell recognation of insulin secretagogues.
In Diabetes. W.J. Malaisse and J. Pirart, Eds. 65-68 Excerpta Medica, Amsterdam

Hellman, B. (1975)
The effect of calcium and divalent ionophores on the stability of isolated insulin secretory granules.
Febs Letters 54, 343-346

Hellman, B. (1976 a)
Stimulation of insulin release after raising extracellular calcium.
Febs Letters 63, 125-128

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1976 b)
Effects of glucose on 45-calcium uptake by pancreatic islets studied with the lanthanum method.
J. Physiol. Lond. 254, 639-56

Hellman, B., Lenzen, S., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1977)
Effects of various modifiers of insulin release on the lanthanum-nondisplaceable 45-calcium uptake by isolated pancreatic islets.
Diabetologia 13, 49-53

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1978)
Effects of Na+, K+ and Mg-2+ on 45-Ca-2+ uptake by pancreatic islets.
Pflügers Arch. 378, 93-97

Hellman,B. (1978)
Calcium and pancreatic ß-cell function. III. Validity of the La-3+-wash technique for discrimating between superficial and intracellular 45-Ca.
Biochim. Biophys. Acta 540, 534-42

Henquin, J.C., Lambert, A.E. (1975)
Cobalt inhibition of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islets.
Am. J. Physiol. 228, 1669-77

Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978)
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: Dissociation between calcium and insulin release.
J. Physiol. Lond. 283, 409-24

Herchuelz, A., Thonnart, Sehci, A., Malaisse, W.J. (1980)
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: The role of membran depolarisation.
Endocrin. 107, 491

Howell, S.L., Montague, W. (1975)
Regulation by nucleotides of 45-calcium uptake in homogenates of rat islets of Langerhans.
Febs Lett. 52, 48-52

Howell, S.L. (1977)
Intracellular localization of calcium in pancreatic B-cells.
Biochem. Soc. Transactions 5, 875

Kervan, A., Girard, J.R. (1976)
Time course of a glucose-induced in plasma insulin in the rat foetus in utero
J. Endocrin. 70, 519-520

Kervan, A., Randon, J. (1980)
Development of insulin release by fetal rat pancreas in vitro. Effects of glucose, pyruvate and theophylline.
Diabetes 29, 673-678

Kikuchi, M., Cuendet, G.S., Renold A.E., Sharp, G.W.G. (1976)
Kinetic study of glucose effect on 45-calcium efflux and insulin release from 46 hour-preloaded rat islets at different temperatures and Ca-2+ concentrations.
(Abstract) Diabetologia 12, 402

Kilo, C., Devrim, S., Bailey, R., Recant, L. (1967)
Studies in vivo and in vitro of glucose-stimulated insulin release. The effects of metabolizable suggars, tolbutamide and 2-desoxyglucose.
Diabetes 16, 377-85

Kosower E.M., Kosower, M.S., Kenety-Londner, H., Levy, L. (1974)
Glutathione IX. New thiol-oxidizing agents: DIP, DIP+, DIP-2+.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 347-351

Lacy, P.E., Kostianovsky, M. (1967)
Method of isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39

Lacy, P.E. (1975)
Endocrine secretory mechanisms.
Am. J. Path. 79, 170-87

Lambert, A.E., Jenrenaud, B., Junod, A., Renold, A.E. (1969)
Organ culture of fetal rat pancreas. II. Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents.
Biochim. Biophys. Acta 174, 540-553

Lambert, E., Kanazawa, Y., Burr, J.M., Orci, L., Renold, A.E. (1971)
On the role of cyclo AMP in Insulin release:
I. Overall effects in cultured fetal rat pancreas.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 185, 232-244

Lambert, A.E., Jeanrenaud, B., Junod, A., Renold, A.E. (1979)
Organ culture of fetal rat pancreas. II. Insulin release induced by amino and organic acids, by normal peptides, by cationic alterations of medium and by other agents.
Biochim. Biophys. Acta 174, 540-553

Lipson, L.G., Bobryckt, V.A., Bush, M.J., Tietjen, G.E., Yoon, A. (1981)
Insulin release in aging: Studies on adenylate cyclase, phosphodiesterase, and protein kinase in isolated islets of Langerhans of the rat.
Endocrinology 108, 620-624

Little-Dike, E.T., Witzel, D.A., Whipp, S.C. (1968)
Insulin: Evidence for inhibition of release in spontaneous hypocalcemia.
Proc. Soc. Exp. Biol. 129, 135-39

Löffler, G., Kemmler, W. (1975)
Cation dependent ATPases in rat islets cell membranes.
Diabetologia 11, 359

Lutz, S. (1981)
Untersuchungen zum Redoxstatus des Glutathionsystems in der Langerhansschen Insel der Ratte. Einfluß von Perinatalzeit, exogenem Insulin und Leucin.
Dissertation, Tübingen

Malaisse, W.J. (1973)
Insulin secretion: Multifactorial regulation for a single release process.
Diabetologia 9, 167-173

Malaisse, W.J., Brisson, G.R., Baird, L.E. (1973)
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. X. Effect of glucose on 45-calcium efflux from perfused islets.
Am. J. Physiol. 224, 389-94

Malaisse, W.J., Devis, G., Herchuelz, A., Sene, A., Somers, G. (1976 a)
Calcium antagonists and islets function. VIII. The effect of magnesium.
Diabete Metab. 2, 1-4

Malaisse, W.J., Herchuelz, A., Levy, J., Sener, A., Pipeleers, D.G., Devis, G., Somers, G., Obberghen, e.van (1976 b)
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XIX. The insolinotropic effect of glyceraldehyd.
Mol. Cell. Endocrin. 4, 1-12

Malaisse, W.J., Devis, G., Pipeleers, D.G., Somers, G. (1976 c)
Calcium antagonists and islets function. VI. Effect of D 600.
Diabetologia 12, 77-81

Malaisse, W.J., Boschero, A.C. (1977 a)
Calcium antagonists and islets function. XI. Effect of nifedipine.
Horm. Res. 8, 203

Malaisse W.J., Herchuelz, H., Levy, J., Sener, A. (1977 b)
Calcium antagonist and islets function. III. The possible site of action of verapamil.
Biochem. Pharmakol. 26, 735-40

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Sener, A., Levy, J., Herchuelz, A., Devis, G., Somers, G. (1978)
Calcium antagonists and islets function. VII. Effect of calcium deprivation.
J. Membr. Biol. 38, 193-208

Malaisse, W.J., Somers, G., Valverde, I., Couturier, E. (1981)
Organic calcium-antagonists and calcium-ionophores.
Arzneim.-Forsch./ Drug Res. 31, 628-33

Matschinsky, F.M., Landgraf, R., Ellermann, J., Kotler-Brajtburg, J. (1972)
Glucosereceptor mechanism in islets of Langerhans.
Diabetes 21, 555-69

Milner, R.D.G. (1969)
The secretion of insulin from fetal and postnatal rabbit pancreas in vitro in response to various substances
J. Endocrin. 44, 267

Mintz, D.H., Chez, R.A., Horger, E.O. (1969)
Fetal insulin and growth hormone metabolism in the subhuman primate.
J. Clin. Invest. 48, 176

Montague, W. (1977)
Cyclic nucleotides, calcium and insulin secretion.
In: Cyclic 3',5'-nucleotides: Mechanism of action.
Eds.: H. Cramer, J. Schultz
Wiley & Sons, London, New York, Toronto, 133-46

Niklas, H. (1978)
Einfluß von Methylenblau, Diamid und t-Butylhydroperoxid auf die Sekretion von Insulin aus der isolierten Langerhansschen Insel des Rattenpancreas.
Dissertation Tübingen

Nolan, S., Stephan, T., Chae, S., Vidalon, C., Gegick, C., Khurana, R.C., Danowsky, T.S. (1973)
Age-related insulin patterns in normal glucose tolerance.
J. Am. Geriatr. Soc. 21, 106:111

Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J., Matschinsky, F.M. (1975)
Iodoacetate and iodoacetamide-induced alterations of pancreatic- and ß-cell responses.
Endocrin. 97, 698-708

Pfeiffer, D.R., Taylor, R.W., Lardy, H.A. (1978)
Ionophore A 23187: Cation binding and transport properties.
Ann. New York Acad. Sci. 402-23

Rasmussen, H. (1970)
Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate.
Science 170, 404-12

Reaven, E.P., Gold, G., Reaven, G.M. (1979)
Effect of age on glucose-stimulated insulin release by the ß-cell of the rat.
J. Clin. Invest. 64, 591-599

Reaven, G.M., Reaven, P.D. (1980)
Effect of age on glucose oxidation by isolated rat islets.
Diabetologia 18, 69-71

Reed, P.W., Lardy, H.A. (1972)
The role of membranes in metabolic regulation.
Academic Press New York 111-31

Remacle, C., Hauser, N., Jeanjean, M., Gommers, A. (1977)
Morphometric analysis of endocrine pancreas in old rats.
Exp. Geront. 12, 207-214

Riet Correa, P., Marques, M., Kraemer, A. (1967)
Insulin release by fetal calf pancreas in vitro:
Influence of glucose or carbutamide.
Amer. J. Physiol. 212, 1402-1404

Robertsen, W.G. (1976)
Cellular calcium and calcium transport.
In: Calcium phosphate and magnesium metabolism, 230-56
Eds.: B.E.C. Nordin, Churchill Livingston, Edinburgh, london,
New York

Sandberg, H., Yoshimine, N., Maeda, S., Symons, D.,
Zavodnick, J. (1973)
Effects of an oral glucose load on serum immunoreactive
insulin, free fatty acid, growth hormone and blood sugar
levels in young and elderly subjects.
J. A. Geriatr. Sci. 21, 433-439

Schäfer, H. (1979)
Zellcalcium und Calciumfunktion.
Veröffentlichungen aus der Pathologie 109,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York seite 95-125

Sener, A., Levy, J., Malaisse, W.J. (1976)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin
release. Does glycolysis control calcium transport in the
B-cell ?
Biochem. J. 156, 521-25

Sener, A., Kawazu, S., Hutton, J.C., Boschero, A.C., Devis,
G., Somers, G., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin
release. Effect of exogenous pyruvate upon islet function.
Biochem. J. 176, 217-32

Sinha, M.K., Mondal, A.M., Rastogi, G.K. (1974)
Influence of age on glucose tolerance in normal subjects.
Acta diabet. lat. 11, 78

Silverstone, F.A., Brandfonbrener, M., Shock, N.W.,
Yiengst, M.J. (1957)
Age differences in the intravenous glucose tolerance tests
and the response to insulin.
J. Clin. Invest. 36, 504-514

Sodoyez-Goffaux, F., Sodoyez, J.C., De Vos, C.J., Foa, P.P.
(1979)
Insulin and glucagon secretion by islets isolated
from fetal and neonatal rats.
Diabetologia 16, 121-123

Sodoyez-Goffaux, F., Sodoyez, J., e Vos, C. (1981)
Evidence for a plancento-insular axis in the rat fetus.
Diabetologia 20, 563-567

Somers, G., Devis, G., Obberghen, E.van, Malaisse, W.J. (1976 a)
Calcium antagonists and islet function. II. Interaction of theophyllin and verapamil.
Endocrin. 99, 114-24

Somers, G., Devis, G., Malaisse, W.J. (1976 b)
Analogy between native and exogenous ionophores in the pancreatic B-cell.
Febs. Lett. 66, 20-22

Sudgen, M.C., Ashcroft, S.J.H. (1978)
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermediates and methylxanthines on calcium uptake by a mitchochondrial fraction from rat pancreatic islets.
Diabetologia 15, 173-80

Taniguchi, H., Hasegawa, M., Kobayashi, T., Watanabe, Y., Seki, M., Murakami, K., Baba, S. (1977)
Restoration by adenosine and theophylline of glucose-induced insulin responsiveness in newborn rats.
Horm. Metab. Res. 9, 257-260

Thorell, J.I. (1970)
Plasma insulin levels in normal human fetuses
Acta Endocrin. (Copenhavn) 63, 134-140

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P. (1972)
Manometric and biochemical techniques.
5th edition, Burgess Pub. Co., Minneapolis USA, p. 146

Valverde, I., Malaisse, W.J. (1979)
Ionophoretic activity in pancreatic islets.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 89, 386-95

Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T. (1979)
Pentose phosphat shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrin. 105, 1269-74

Willes, R.F., Boda, J.M., Manns, J.G. (1969)
Insulin secretion by the bovine fetus in utero.
Endocrinology 84, 520

Woldow, A., Shapiro, B., Cohen, J., Kollman, G. (1972)
Relationship of lipids to glucose tolerance and insulin response in the aged.
J. Am. Geriatr. Soc. 20, 515-520

Yoshino, G., Kamuzi, T., Kobayashi, N., Terashi, K., Morita, S., Baba, S. (1979)
Insulin and glucagon relationships during aging in rats.
Endocrinol. Japon. 26, 325-329

Zeytinoglu, I.Y., Gherondache, C.N., Pincus, G. (1969)
The process of aging: Serum glucose and immunoreactive insulin levels during the oral glucose tolerance test.
J. Am. Geriatr. Soc. 17, 1-14

Lebenslauf

Am 29. April 1954 wurde ich, Wolfgang Strölin, als Sohn des Apothekers Klaus Strölin und seiner Frau Ingeborg, geborene Nothardt, ebenfalls Apothekerin, in Stuttgart geboren.

Vom Frühjahr 1960 bis 1964 besuchte ich die Burgschule in Esslingen und wechselte anschließend an das Georgii Gymnasium in Esslingen über, wo ich im Sommer 1973 das Abitur bestand.

Von Oktober 1973 bis September 1975 leistete ich als Zeitsoldat bei der Bundesmarine meinen Wehrdienst ab.

Im Oktober 1975 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium der Pharmazie auf und bestand im Frühjahr 1978 den ersten Teil, im Sommer 1979 den zweiten Teil des pharmazeutischen Staatsexamens. Anschließend arbeitete ich in der Apotheke am Fischbrunnen in Esslingen als Praktikant. Im Herbst 1981 bestand ich den dritten Teil des pharmazeutischen Staatsexamens und erhielt daraufhin die Approbation.

Am 1. April 1980 begann ich an der Universität Tübingen bei Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon mit der vorliegenden Dissertation, die ich im Winter 1982/83 zu Ende führte.

Während meiner ganzen Arbeit an der Dissertation war ich als wissenschaftliche Hilfskraft bei Herrn Professor Dr. E. Reinhard, Pharmazeutisches Institut Tübingen, angestellt.

Am 19. September 1981 heiratete ich Frau Dr. Susanne Strölin, geborene Lutz aus Öhringen.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Professoren

H. Auterhoff und K.-A. Kovar (Pharm. Chemie),

E. Graf (Pharm. Technologie),

E. Reinhard (Pharm. Biologie),

J. Schultz (Biochemie),

E. Lindner (Anorg. Chemie),

E. Bayer (Org. Chemie),

R.E. Bader (Med. Mikrobiologie),

H. Seiler (Physik).